



## 저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

생활과학석사학위논문

UPLC를 이용한  
카로티노이드 동시 분석법  
확립 및 식품에의 적용

Method Development for the Analysis  
of Various Carotenoids Using UPLC  
and Quantitative Analysis in Foods

2014년 8월

서울대학교 대학원

식품영양학과

황 정 록

UPLC를 이용한  
카로티노이드 동시 분석법  
확립 및 식품에의 적용

Method Development for the Analysis  
of Various Carotenoids Using UPLC  
and Quantitative Analysis in Foods

지도교수 황 인 경

이 논문을 생활과학석사 학위논문으로  
제출함

2014년 8월

서울대학교 대학원

식품영양학과

황 정 록

황정록의 생활과학석사 학위논문을 인준함

2014년 8월

위 원 장 \_\_\_\_\_ (인)

부 위 원 장 \_\_\_\_\_ (인)

위 원 \_\_\_\_\_ (인)

## 국문초록

본 연구는 UPLC를 이용하여 10종 카로티노이드(neoxanthin, capsorubin, violaxanthin, capsanthin, zeaxanthin, lutein,  $\beta$ -cryptoxanthin, lycopene,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene)를 30분 내에 분석할 수 있는 방법을 개발 및 검증하였고, 이를 이용하여 여러 가지 색을 갖는 생시료 내의 카로티노이드를 정량 분석하였다.

시료의 추출에는 가속용매추출장치(ASE, accelerated solvent extractor)를 이용하였다. ASE는 고온과 고압 조건에서 추출하여 용매와 시간이 적게 소요되기 때문에 추출 효율이 높으며 불필요한 산화 등을 최소화할 수 있다. 기기 조건은 static time 3min, static cycles 3회, solvent flush% 60vol, nitrogen purge 60s, pressure 1500psi, temperature 80℃이며 acetone으로 추출하였다.

UPLC(Ultra Performance Liquid Chromatography)는 1.7~1.8 $\mu$ m 크기 입자의 컬럼을 이용하기 때문에 2.1 $\mu$ m 크기 입자의 컬럼을 이용하는 HPLC에 비해 높은 압력에서의 분석이 가능하여 분리능이 뛰어나며 분석 시간이 단축되고 시료 및 용매의 사용량을 줄이기 때문에 경제적이고 친환경적인 장점이 있다.

카로티노이드 분석에 적합한 UPLC 컬럼군을 선택하기 위해 BEH 컬럼과 HSS 컬럼을 이동상의 혼합 비율, 농도 구배 조건, 속도 등의 조건에서 비교한 결과, 확립한 분석법은 HSS T3 컬럼을 이용하고 acetonitrile:methanol:methylene chloride 혼합 용매와 증류수의 이동상을 이용하며 30분의 총 분석 시간을 갖는다.

확립한 분석 조건의 타당성을 살피기 위해 capsanthin을 이용하여 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantification, LOQ), 정밀성(precision), 정확성(accuracy)을 검증

(Validation)하였다. Capsanthin에 대한 검량선은 1~200 $\mu$ g/mL 농도 범위에서 상관계수( $R^2$ ) 0.9998의 높은 직선성을 나타내었고 각각 2.4  $\mu$ g/mL, 7.2 $\mu$ g/mL의 검출한계와 정량한계를 나타내었다. 일내 RSD 값은 1.57~3.09%, 일간 RSD값은 1.98~3.83%를 나타냈으며, 회수율은 일내와 일간에서 각각 91.86~94.98%, 98.10~99.87%의 값을 나타내어 분석에 적합함을 알 수 있었다.

확립한 분석법을 이용하여 카로티노이드가 풍부한 붉은색 파프리카 3종, 주황색 파프리카 1종, 노란색 파프리카 2종, 녹색 파프리카 2종, 붉은색과 녹색의 피망, 고추, 그리고 단호박 3종을 수집하여 카로티노이드 정량 분석을 실시하였다. 붉은색 파프리카에는 capsanthin(14.70~18.48 mg/100g dry weight)이 가장 많이 존재하였으며, 주황색, 노란색, 녹색 파프리카에는 zeaxanthin(31.37 $\pm$ 2.81 mg/100g dw, 2.23 $\pm$ 0.04 mg/100g dw, 4.40 $\pm$ 1.89 mg/100g dw)이 가장 많이 존재하였다. 붉은색 피망과 고추에는 capsanthin(27.94 $\pm$ 0.54 mg/100g dw, 91.89 $\pm$ 0.30 mg/100g dw)이 가장 많이 존재하였으며, 녹색 피망과 고추에는 lutein(6.43 $\pm$ 0.08 mg/100g dw, 12.44 $\pm$ 0.17 mg/100g dw)이 가장 많이 존재하였다. 단호박에는 lutein(5.39~23.44 mg/100g dw)이 가장 많이 존재하였다. 본 연구에서의 분석조건을 이용하여 다양한 카로티노이드가 존재하는 것으로 알려진 생시료 및 가공품을 보다 정확하고 신속하게 정량 분석할 수 있을 것으로 생각한다.

주요어 : 카로티노이드, UPLC, 분석법 검증, 파프리카, 고추, 단호박

학 번 : 2012-23550

## 목 차

국문초록 .....	i
목차 .....	iii
표목차 .....	v
그림목차 .....	vi
I. 서론 .....	1
II. 실험재료 및 전처리 .....	5
1. 실험재료 및 기기 .....	5
2. 시료의 전처리 .....	6
2.1. 가속 용매 추출법(ASE)을 이용한 추출 .....	6
2.2. 검화 및 분획 .....	6
III. 분석 조건 확립 및 검증 .....	8
1. 분석 조건 확립 .....	8
1.1. 컬럼의 선택 .....	8
1.2. 이동상의 혼합 비율 및 농도 구배 조건 선택 .....	12
1.3. 유속 및 분석 시간 결정 .....	20
2. 분석 조건의 검증 .....	25

2.1. 직선성(Linearity)	25
2.2. 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)	28
2.3. 정밀도(Precision) 및 정확도(Accuracy)	28
IV. 정량 결과 및 고찰	32
1. 생시료의 정량 평가	32
1.1. 시료의 크로마토그램	32
1.2. 통계처리	48
2. 결과 및 고찰	48
V. 요약 및 결론	52
참고문헌	55
Abstract	59

## 표 목차

Table 1. Analytical conditions for the separation of carotenoids using UPLC systems .....	9
Table 2. Analytical condition for the separation of carotenoids in 30 minutes .....	23
Table 3. Linearity of capsanthin 1-200 $\mu$ g/mL .....	26
Table 4. Raw data of intra- and inter-day experiments .....	29
Table 5. Intra- and inter-day precision and accuracy of developed method .....	30
Table 6. Carotenoids contents in different colored paprika, bell pepper, pepper and sweet pumpkin .....	49



## 그림 목차

Figure 1. Carotene and xanthophyll biosynthetic pathway .....	4
Figure 2. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in red paprika. Samples were separated on BEH C18 column in 15 minutes. ....	10
Figure 3. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in red paprika. Samples were separated on HSS T3 column in 46 minutes. ....	11
Figure 4. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in red paprika. Samples were separated on BEH C18 column. Column was eluted with solvent A:B = 70:30; (A) acetonitrile:methanol:methylene chloride = 75:15:10, (B) water. ....	13
Figure 5. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in red paprika. Samples were separated on BEH C18 column. Column was eluted with solvent A:B = 75:25; (A) acetonitrile:methanol:methylene chloride = 75:15:10, (B) water. ....	14

Figure 6. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in red paprika. Samples were separated on BEH C18 column. Column was eluted with solvent A:B = 70:30; (A) acetonitrile:methanol:methylene chloride = 65:25:10, (B) water. .... 15

Figure 7. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in red paprika. Samples were separated on BEH C18 column. Column was eluted with solvent A:B = 75:25; (A) acetonitrile:methanol:methylene chloride = 65:25:10, (B) water. .... 16

Figure 8. UPLC chromatograms of carotenoid profiles in red paprika. Samples were separated on BEH C18 column. Column was eluted with solvent A:B = 95:5, 85:15, 80:20, 77:23 in 11.5min~25min, respectively; (A) acetonitrile:methanol:methylene chloride = 65:25:10, (B) water. .... 18

Figure 9. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in red paprika. Samples were separated on BEH C18 column. Column was eluted with solvent A:B = 100:0 in 24.5min~42min; (A) acetonitrile:methanol:methylene chloride = 65:25:10, (B) water. .... 19

Figure 10. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in red paprika. Samples were separated on BEH C18 column in 37 minutes. .... 21

Figure 11. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in red paprika. Samples were separated on BEH C18 column in 30 minutes. ....	22
Figure 12. UPLC chromatogram of carotenoid standards and $\beta$ -apo-8'-carotenal(internal standard). ....	24
Figure 13. Calibration equation of capsanthin 1-200 $\mu$ g/mL. ....	27
Figure 14. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in red paprika. (red mountain) Samples were separated on BEH C18 column. ....	33
Figure 15. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in red paprika. (veyron) Samples were separated on BEH C18 column. ....	34
Figure 16. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in red paprika. (scirocco) Samples were separated on BEH C18 column. ....	35
Figure 17. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in orange paprika. (orange pro) Samples were separated on BEH C18 column. ....	36
Figure 18. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in yellow paprika. (fiesta) Samples were separated on BEH C18 column. ....	37

Figure 19. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in yellow paprika. (volante) Samples were separated on BEH C18 column. ....	38
Figure 20. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in green paprika. (red mountain) Samples were separated on BEH C18 column. ....	39
Figure 21. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in green paprika. (veyron) Samples were separated on BEH C18 column. ....	40
Figure 22. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in red bell pepper. Samples were separated on BEH C18 column. ....	41
Figure 23. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in green bell pepper. Samples were separated on BEH C18 column. ....	42
Figure 24. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in red pepper. Samples were separated on BEH C18 column. ....	43
Figure 25. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in green pepper. Samples were separated on BEH C18 column. ....	44

Figure 26. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in sweet pumpkin (evis). Samples were separated on BEH C18 column. ....	45
---	----

Figure 27. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in sweet pumpkin (tcup). Samples were separated on BEH C18 column. ....	46
---	----

Figure 28. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in sweet pumpkin (kuriyutaka). Samples were separated on BEH C18 column. ....	47
---	----

## I. 서론

카로티노이드(Carotenoids)는 식물과 미생물에 의해 합성되는 붉은 색, 주황색, 노란색의 지용성 색소물질로서 polyisoprenoid 구조를 갖는 물질이다. 인간을 포함한 동물은 체내에서 합성할 수 없으므로 식이를 통해 섭취해야 한다. 카로티노이드가 생성되는 과정은 Fig. 1과 같이 나타낼 수 있다. (Guzman 등 2010)

카로티노이드는 산소 라디칼과 일중항 산소를 소거하는 항산화 작용을 하며(Elliott 2005, Stahl 등 2005) 면역 증진 및 암, 심혈관 질환, 백내장, 황반 변성과 같은 퇴행성 질환에 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(Krinsky 등 2005, Tapiero 등 2004, Voutilainen 등 2006). 또한 일부 카로티노이드는 비타민 A의 전구체로서, 비타민 A를 공급하는 역할을 할 수 있다. 식물에 있어서는 성장과 발달의 조절 작용과 함께 광합성에 관여하며, abscisic acid와 같은 호르몬의 전구체 역할을 한다(Matthews 등 2003).

카로티노이드는 구조에 따라 크게 탄소와 수소로만 이루어진 카로틴(Carotene)류와 산소와 함께 다양한 작용기들이 치환된 형태인 잔토피(Xanthophyll)류의 두 가지로 분류할 수 있으며 각각의 구조가 다른 만큼 극성에도 차이가 있다.

여러 가지의 카로티노이드 중에서도 각각의 단일 물질에 대한 기능성을 탐색하는 연구가 증가하고 있다. Neoxanthin은 전립선암세포의 apoptosis를 유도하는 것으로 연구되었으며(Kotake-Nara 등 2005), violaxanthin은 유방암세포의 증식을 막고(Pasquet 등 2011) 항염증 효과를 갖는 것으로 연구되었다(Soontornchaiboon 등 2012). Capsanthin과 capsorubin은 *Capsicum* 종에만 존재하는데, capsanthin은 백혈병 세포 활성을 억제하는 것으로 연구되었다(Zhang 등 2011). Zeaxanthin과 lutein은 체내에서 혈액을 통해 수정

체와 황반에 침착되며 항산화능 및 자외선 흡수능을 가지고 있어 눈 건강에 도움을 준다고 알려져 있다(Kim 등 2012, Chan 등 1998, Semba 등 2003, Krinsky 등 2003). Lycopene은 전립선암 예방과 관련이 있으며(Chen 등 2012)  $\beta$ -cryptoxanthin은 면역 관련 질병에 유익한 효과를 나타낼 수 있으며(Ghodratizadeh 등 2014) 폐암 발생과 반비례 관계를 나타내는 것으로 연구되었다(Miller 등 2012).

크로마토그래피를 이용한 카로티노이드 분석에는 액체 크로마토그래피를 이용한다. 기체 크로마토그래피는 카로티노이드의 불안정성과 낮은 휘발성 때문에 적합하지 않다. 가장 많이 쓰이는 크로마토그래피 분석법은 C18이나 C30 컬럼을 이용한 역상 HPLC 분석이다. 최근에는 더 작은 입자로 충전된 컬럼을 이용하는 UPLC(Ultra Performance Liquid Chromatography)를 이용한 분석이 등장하여 점차 늘고 있는 추세이다. HPLC는 2.1 $\mu$ m 크기 입자의 컬럼을 이용하는 데 비해 UPLC는 1.7~1.8 $\mu$ m 크기 입자의 컬럼을 이용하기 때문에 더 높은 압력(최대 15000 psi)에서 분석을 수행하여 더 좋은 분리능을 얻을 수 있다. 이론적으로 작은 입자는 H(이론단의 높이)를 감소시키고 이는 이론 단수(theoretical plates)를 증가시켜 컬럼 효율을 증가시킨다. 또한 입자가 작기 때문에 시료가 통과하는 길이가 더 짧아지므로 빠른 분석이 가능하다(Rivera 등 2012). 덧붙여 UPLC 시스템은 시료 및 용매의 사용량이 현저히 작기 때문에 HPLC에 비해 더 경제적이고 친환경적인 장점이 있다.

UPLC 컬럼은 2004년 Waters사에서 처음 개발된 이후로 점차 제품 수를 늘려왔다. HPLC에 비하면 역사가 짧기 때문에 UPLC를 이용하여 카로티노이드를 분석한 논문은 수도 적고 다양하지 못하며 일반적으로 통용되는 분석 조건도 미미한 단계이다. 또한 식품 내 카로티노이드의 정확한 정량 분석은 작물의 품종 선택이나 생산 및 수확 후 처리 단계, 식이 가이드라인 설정, 섭취량과 질병 예방 간의 관계 연구 등에서 필수적이다(Rodriguez-Amaya 2010). 한편 현

재까지의 카로티노이드 성분 연구는 프로비타민 A인  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene,  $\beta$ -cryptoxanthin과 함께 lycopene, lutein, zeaxanthin에만 초점이 맞춰져 왔는데, 최근에는 다양한 잔토필류의 기능성이 밝혀짐에 따라 더 많은 종류의 카로티노이드를 동시에, 또한 더 짧은 시간 안에 정확하게 정량 분석을 해야 할 필요성이 증가하고 있다.

따라서 본 연구에서는 UPLC를 이용, 대표적인 컬럼군인 BEH 컬럼과 HSS 컬럼 중 적절한 컬럼을 선정된 뒤 크로마토그래피 이동상의 혼합 비율, 농도 구배 조건, 속도 등을 비교하여 neoxanthin, capsorubin, violaxanthin, capsanthin, zeaxanthin, lutein,  $\beta$ -cryptoxanthin, lycopene,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene의 10종 카로티노이드를 동시 분석할 수 있는 조건을 찾고, 이 조건에서의 분석법을 검증하였다. 이후 다양한 색과 품종의 생시료에서 10종의 카로티노이드를 정량 분석하였다.



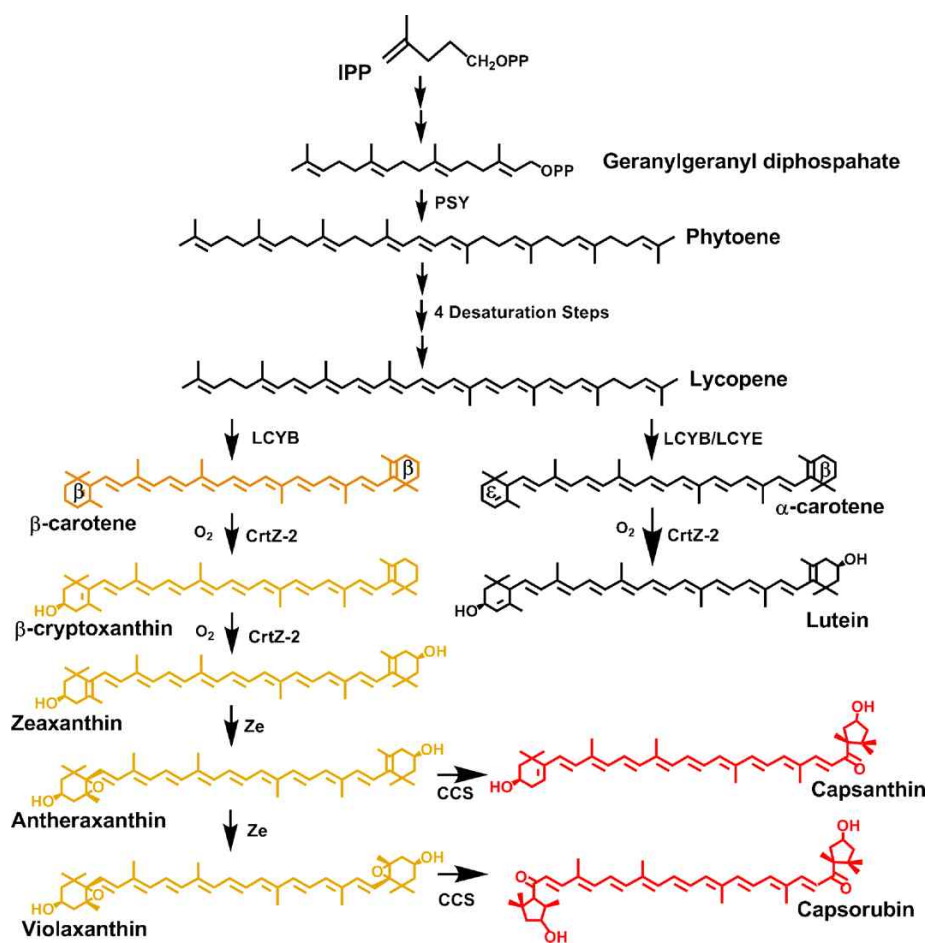


Fig. 1. Carotene and xanthophyll biosynthetic pathway.

## II. 실험재료 및 전처리

### 1. 실험재료 및 기기

본 실험에 사용한 시료인 파프리카는 붉은색 3종(red mountain, veyron, scirocco), 주황색 1종(orange pro), 노란색 2종(fiesta, volante), 녹색 2종(red mountain, veyron)이며, 피망(붉은색, 녹색), 고추(붉은색, 녹색), 단호박 3종(evis, tcup, kuriyutaka)은 2014년 3월에 서울 지역의 마트에서 구입하였다. 모든 시료는 수세한 후 동결 건조하여 850 $\mu$ m 크기의 분말로 갈아서 실험에 사용하였다.

추출 및 전처리에 사용한 acetone, methanol, potassium hydroxide, diethyl ether는 Junsei Chemical(Tokyo, Japan)에서 구입하였다. 여과에 사용한 MILLEX-HV 0.22 $\mu$ m PTEF syringe filter는 Millipore Corp.(Bedford, MA, USA)에서 구입하였다. 표준품으로 사용한 neoxanthin, capsorubin, violaxanthin, capsanthin, zeaxanthin, lutein,  $\beta$ -cryptoxanthin, lycopene,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene은 Carotenature(Lupsingen, Switzerland)에서 구입하였으며, 내부 표준품으로 사용한  $\beta$ -apo-8'-carotenal은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. LC 분석에 사용한 용매인 acetonitrile, methanol, methylene chloride는 Avantor(Center Valley, PA, USA)의 LC grade를 구입하여 사용하였다. H<sub>2</sub>O는 AquaMAX™ Ultra(YoungLin Instrument Co. Ltd., Seoul, Korea)를 사용하여 18.2m $\Omega$  수준으로 정제된 증류수를 사용하였다.

이용한 기기는 다음과 같다. 시료의 추출에 가속용매추출장치(ASE, accelerated solvent extraction, ASE 150, Dionex, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하였고, 용매를 농축하는 데에 TurboVap LV(Biotage, Uppsala, Sweden)을 이용하였다. 분석에 있

어서는 Acquity UPLC H-Class(Waters, USA)를 이용하였다. 분석 기기의 구성은 Tunable UV(TUV) 검출기, 컬럼 오븐, sample manager(Flow Through Needle injector, FTN), Quaternary Solvent Manager(QSM) 및 Empower 3 chromatography software 로 이루어졌다.

## 2. 시료의 전처리

### 2.1. 가속 용매 추출법(ASE)을 이용한 추출

모든 시료는 가속용매추출장치(ASE, accelerated solvent extractor)를 이용하여 추출하였다. 추출용 cell(22mL)에 cellulose filter(Dionex, USA)를 끼운 뒤에, thimble(ASE-Non-Stick Thimbles for extraction, Whatman, Schleicher & Schuell, Bioscience, Dassel, Germany)을 넣고, thimble 안에 시료 1g과 규조 토(ASE Prep Diatomaceous Earth, Dionex, USA)를 넣고 잘 섞어서 압착한 뒤에 추출하였다. 기기 조건은 static time 3min, static cycles 3회, solvent flush% 60vol, nitrogen purge 60s, pressure 1500psi, temperature 80℃이며 acetone으로 추출하였다. 추출 후 collection vial에 수집된 용매를 TurboVap LV를 이용, 50℃ 수욕상에서 질소 가스로 3mL로 농축하였다.

### 2.2. 검화 및 분획

검화는 acetone 추출액 3mL에 methanol 3mL와 30% KOH/MeOH 1mL를 혼합한 뒤, 암실에서 2시간 30분을 방치한 뒤, diethyl ether

로 추출하였다. Diethyl ether 추출액 중의 수분을 제거하기 위해 증류수, 10% NaCl 용액을 첨가하여 층 분리를 시킨 뒤 상층액만을 분획하였다. 회수한 상층액에 2% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액을 첨가하여 순수한 diethyl ether 층만을 얻었다. 이를 TurboVap LV을 이용하여 감압 농축한 뒤 acetone 2mL에 녹이고, 0.22 $\mu$ m PTEF syringe filter로 여과하여 이를 분석에 이용하였다.

### Ⅲ. 분석 조건 확립 및 검증

#### 1. 분석 조건 확립

UPLC를 이용하여 카로티노이드를 분석한 논문을 참조하여(Rivera 등 2012) 잔토필류를 포함한 다양한 카로티노이드를 분석한 논문을 비교하였다. 1편은 BEH C18 컬럼을 이용하였고(Rivera 등 2011), 1편은 HSS T3 컬럼을 이용하였다(Chauveau-Duriot 등 2010). 붉은색 파프리카를 이용, 위의 두 조건으로 분석을 수행하여 크로마토그램의 피크를 살펴보았다. 이후 한 종류의 컬럼을 선정하였고 이동상과 유속 및 분석 시간을 변형하여 더 빠르고 간편한 분석 조건을 찾으려 하였다.

##### 1.1. 컬럼의 선택

기존 논문에서 제시된 각각의 컬럼 및 조건은 Table. 1과 같으며, 이 조건으로 붉은색 파프리카를 분석한 결과는 Fig. 2, 3과 같다.

BEH 컬럼군은 silica와 alkane polymer의 hybrid 물질을 충전재로 하는 컬럼으로서 넓은 pH 범위(1~12)와 온도 범위를 갖는 특징이 있다. pH 안정성에 최적화 되어 있으며 역상 컬럼으로는 BEH C18 컬럼이 가장 많이 사용되고 있다. HSS 컬럼군은 high strength silica를 충전재로 하는 컬럼으로 선택성에 최적화 되어 있기 때문에, 일반 silica 컬럼과는 다른 선택성을 요구할 때 시도할 수 있는 컬럼이다. 이 중에서도 HSS T3 컬럼은 역상 분석에 있어서 극성 화합물의 retention을 증진시키는 특징을 갖는다.



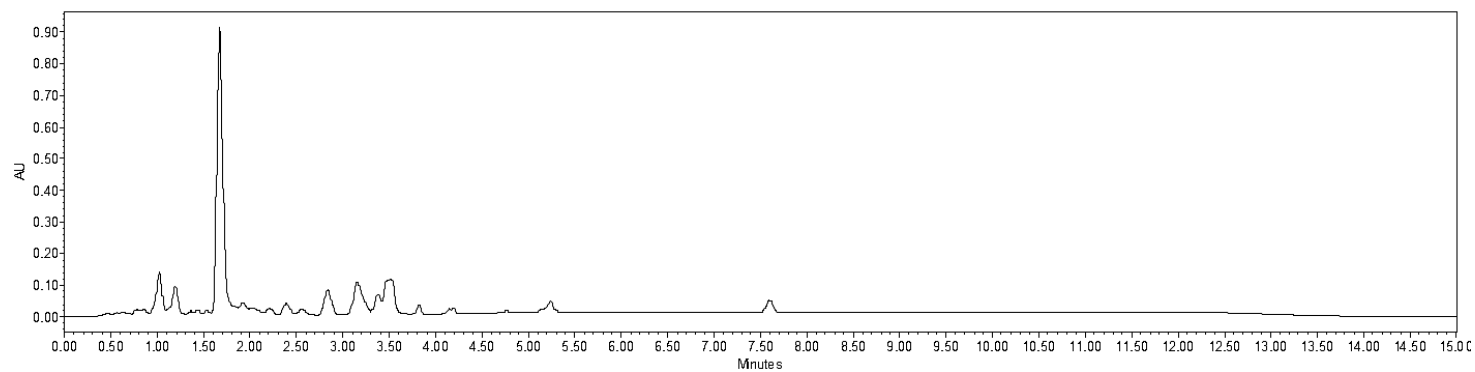


Fig. 2. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in red paprika. Samples were separated on BEH C18 column in 15 minutes.

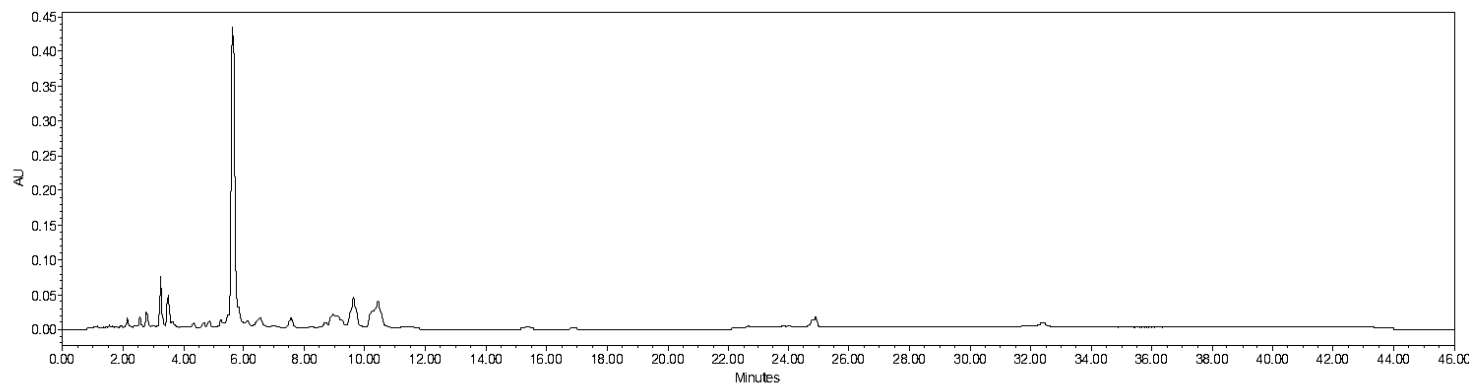


Fig. 3. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in red paprika. Samples were separated on HSS T3 column in 46 minutes.



BEH C18 컬럼을 이용한 Fig. 2와 HSS T3 컬럼을 이용한 Fig. 3을 비교해보면, BEH C18 컬럼에서 총 분석 시간이 짧지만, 비교적 극성이 있는 잔토피류의 피크가 깨끗하게 분리되지 않는 것을 확인할 수 있다. 반면 HSS T3 컬럼에서는 분석 시간은 길지만 잔토피류의 피크가 더 잘 분리되어 있기에 다음의 분석 조건 확립에서는 HSS T3 컬럼을 이용하였다.

## 1.2. 이동상의 혼합 비율 및 농도 구배 조건 선택

이동상은 acetonitrile, methanol, methylene chloride의 혼합 용액을 Solvent A로 그대로 유지하기로 하였으나, 세 가지 유기용매의 혼합 비율과 함께 시작 조건인 Solvent B와의 비율을 변화시켜보았다. 한편 논문의 조건에서 염을 첨가한 증류수를 Solvent B로 사용하였으나, 본 연구에서는 염을 첨가하지 않은 증류수와 비교하였을 때 큰 차이가 없다고 판단하여 Solvent B는 순수한 증류수를 사용하기로 결정하였다.

즉, ‘Acetonitrile:methanol:Methylene Chloride = 75:15:10 and 65:25:10’의 경우와 ‘Solvent A : B = 70:30 and 75:25’의 4가지 경우를 비교하였으며 그에 대한 크로마토그램은 Fig. 4, 5, 6, 7과 같다.

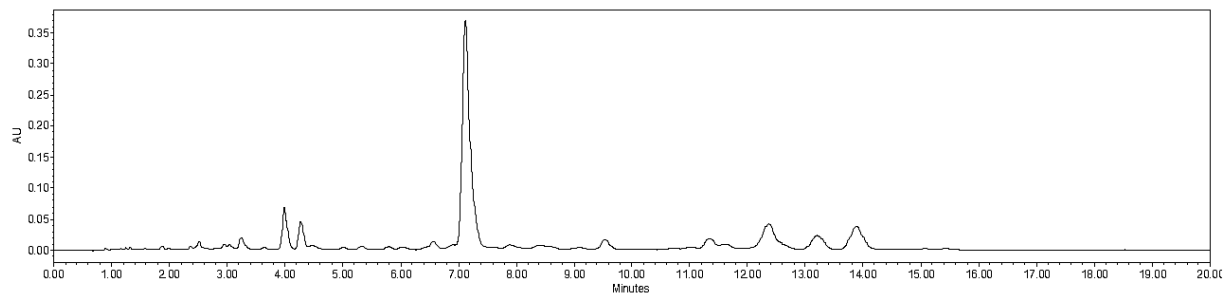


Fig. 4. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in red paprika. Samples were separated on BEH C18 column. Column was eluted with solvent A:B = 70:30; (A) acetonitrile:methanol:methylene chloride = 75:15:10, (B) water.

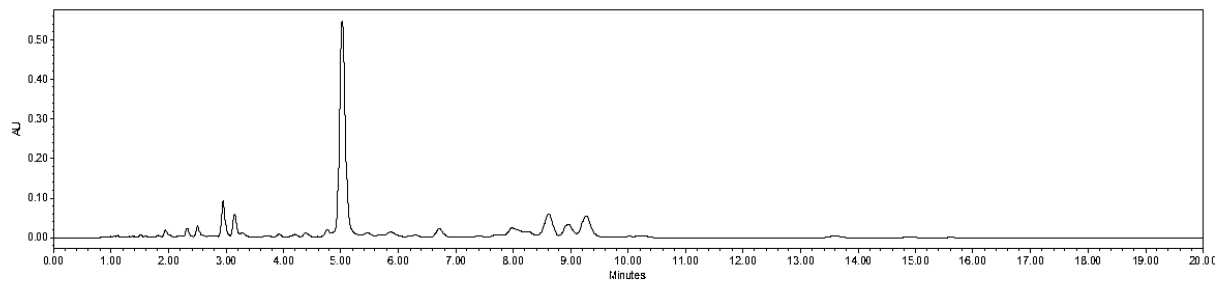


Fig. 5. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in red paprika. Samples were separated on BEH C18 column. Column was eluted with solvent A:B = 75:25; (A) acetonitrile:methanol:methylene chloride = 75:15:10, (B) water.

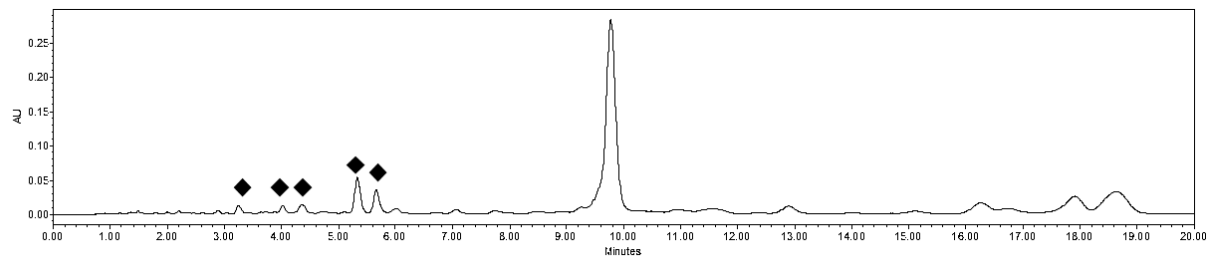


Fig. 6. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in red paprika. Samples were separated on BEH C18 column. Column was eluted with solvent A:B = 70:30; (A) acetonitrile:methanol:methylene chloride = 65:25:10, (B) water.

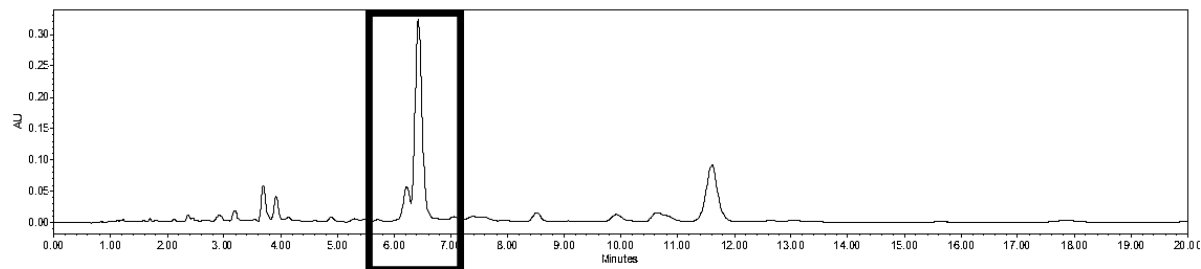


Fig. 7. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in red paprika. Samples were separated on BEH C18 column. Column was eluted with solvent A:B = 75:25; (A) acetonitrile:methanol:methylene chloride = 65:25:10, (B) water.

Fig. 4, 5과 6, 7을 비교해 볼 때, Solvent A (65:25:10) 혼합의 경우에 잔토필류의 retention이 증가하여 피크 사이의 간격을 넓힐 수 있었다. 피크가 빠른 시간에 나오도록 할수록, 즉 피크의 retention을 감소시킬수록 강한 용매라는 표현을 하는데 acetonitrile의 경우 methanol보다 강한 용매이기 때문에, 65:25:10 비율에서 acetonitrile의 비율이 줄고 그에 따라 retention이 증가한 것으로 판단할 수 있다.

한편 Fig. 6과 7을 비교해 볼 때 앞에서 나타나는 5개의 피크가 Solvent A 70%의 시작 조건에서 retention이 더 증가하는 것을 볼 수 있었다. 추가적으로 붉은색 파프리카의 가장 큰 피크가 Solvent A 75% 조건에서 분리되는 것이 발견되어, 이 피크의 retention time 근처에서는 Solvent A를 75% 조건으로 농도 변경하는 것을 선택하였다.

다음으로 Fig. 8는 가장 큰 피크가 나온 이후 시간에서의 농도 구배 조건을 찾기 위한 분석 결과이다. 4번의 분석 중에서 Solvent A 70%일 때 피크들의 분리가 가장 좋았으며, 그림에서는 나타내지 않았지만 그보다 낮은 Solvent A 비율에서는 피크의 모양이 너무 퍼져서 적절하지 않았다.

잔토필류 중에서도 비교적 비극성이 큰  $\beta$ -cryptoxanthin이나 카로틴류인 lycopene,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene의 경우 비극성이 강하기 때문에 유기 용매(Solvent A)의 비율이 100%로 증가해야지만 46분 안에서 피크가 나타날 수 있었다(Fig. 9).

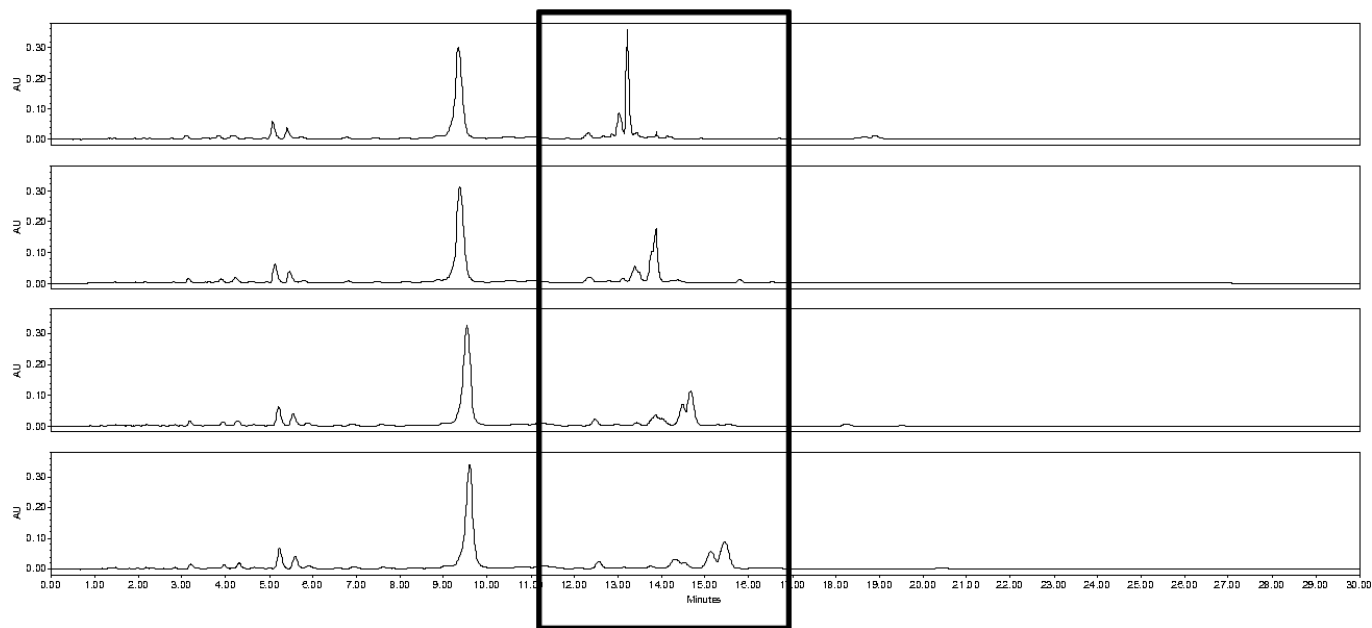


Fig. 8. UPLC chromatograms of carotenoid profiles in red paprika. Samples were separated on BEH C18 column. Column was eluted with solvent A:B = 95:5, 85:15, 80:20, 77:23 in 11.5min~25min, respectively; (A) acetonitrile:methanol:methylene chloride = 65:25:10, (B) water.

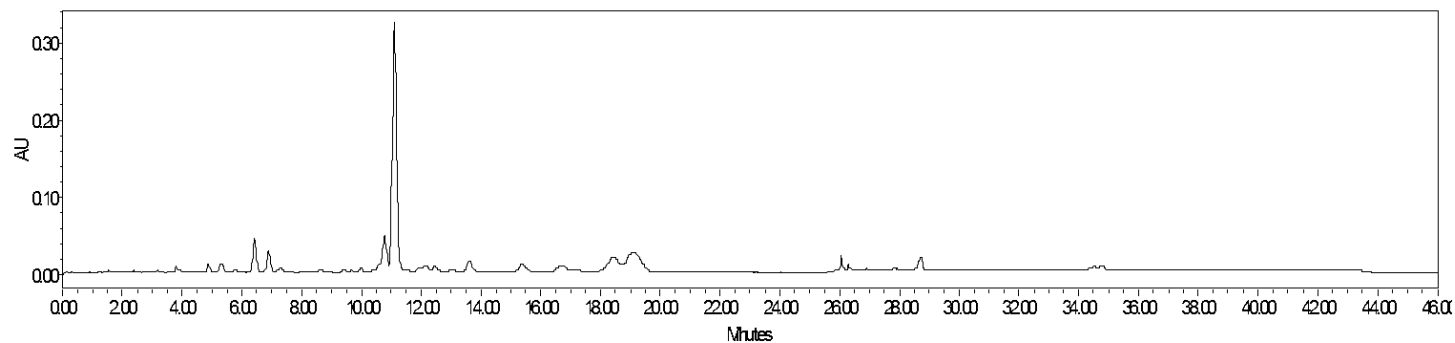


Fig. 9. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in red paprika. Samples were separated on BEH C18 column. Column was eluted with solvent A:B = 100:0 in 24.5min~42min; (A) acetonitrile:methanol:methylene chloride = 65:25:10, (B) water.



### 1.3. 유속 및 분석 시간 결정

HPLC에서 카로틴류(lycopene,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene)를 분석하는 데에는 보통 55~60분 이상의 분석 시간을 필요로 한다. UPLC를 이용하였음에도 46분의 분석 시간이 필요하다면 좋은 분석법이라 할 수 없다. 따라서 0.4mL/min의 유속을 이용한 앞에서의 분석과 달리 유속을 0.5mL/min으로 증가시켰다(Fig. 10). 0.4mL/min 유속에서는 통상 6500~7000 psi의 최고 압력을 나타내고, 0.5mL/min 유속에서는 8000~8500 psi의 최고 압력을 나타낸다. UPLC는 최고 15000 psi의 압력이 가능하기 때문에 8000~8500 psi의 압력은 분석하는 데 있어 무리를 주지 않는 압력이라고 판단하였다.

또한 표준품이나 시료에서 피크가 나타나지 않는 부분을 없애는 방법으로 총 분석 시간을 줄일 수 있었고(Fig. 11), 최종적으로 30분의 분석 시간에 10종의 카로티노이드를 분석하는 조건을 확립하였다. 최종 분석 조건(Table. 2)과 10종 표준품의 크로마토그램(Fig. 12)은 다음과 같다.

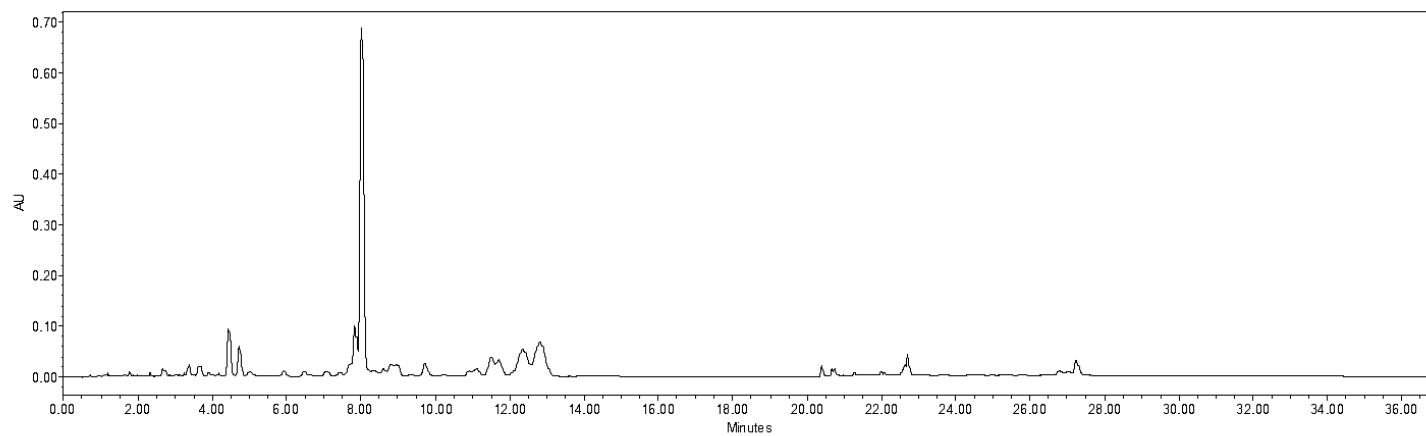


Fig. 10. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in red paprika. Samples were separated on BEH C18 column in 37 minutes.

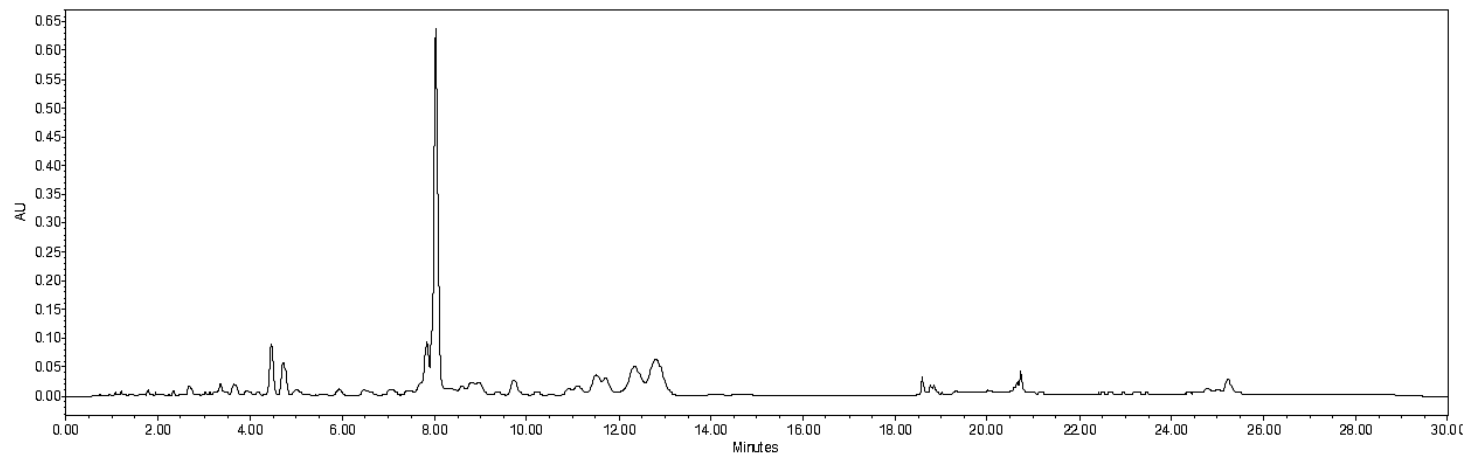
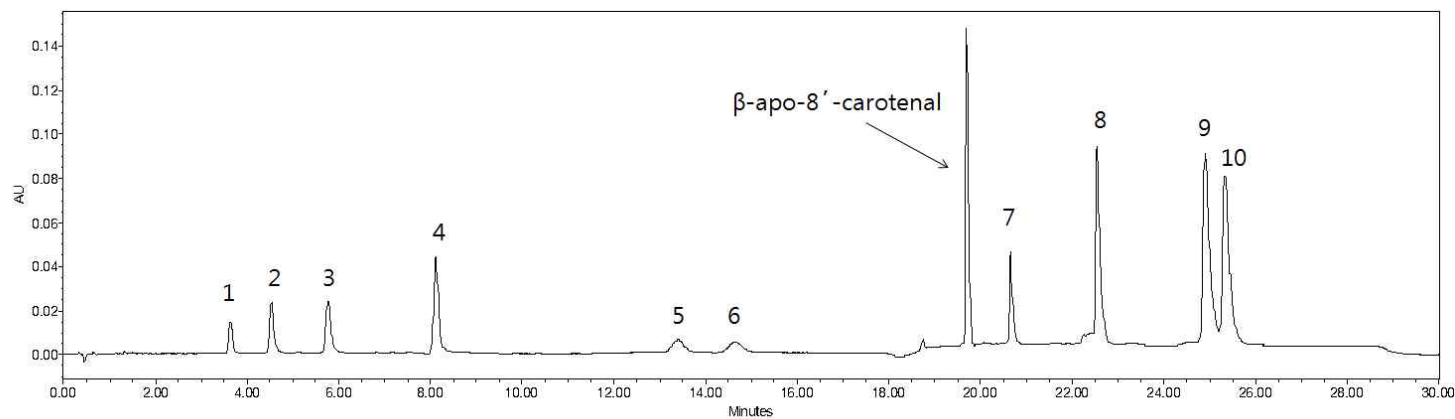


Fig. 11. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in red paprika. Samples were separated on BEH C18 column in 30 minutes.

**Table 2. Analytical condition for the separation of carotenoids in 30 minutes.**

Column : HSS T3 column (2.1mm * 100mm, 1.8μm)	Gradient		
Column temp. : 35°C	min	(A)	(B)
	0	70	30
Run time : 30 min	6.5	70	30
	7	75	25
	11	75	25
Flow rate : 0.5 mL/min	11.5	70	30
	17	70	30
Mobile phase	17.5	100	0
(A) Acetonitrile / Methanol / Methylene Chloride (65/25/10)	27.5	100	0
(B) D.W	28	70	30
	30	70	30
Wavelength : 450nm			



**Fig. 12. UPLC chromatogram of carotenoid standards and  $\beta$ -apo-8'-carotenal(internal standard).**

1 : neoxanthin, 2 : capsorubin, 3 : violxanthin, 4 : capsanthin, 5 : zeaxanthin,  
6 : lutein, 7 :  $\beta$ -cryptoxanthin, 8 : lycopene, 9 :  $\alpha$ -carotene, 10 :  $\beta$ -carotene

## 2. 분석 조건의 검증

확립한 분석 조건의 타당성을 살피기 위해 직선성(Linearity), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantification, LOQ), 정밀성(precision), 정확성(accuracy)을 검증(Validation)하였다. 검증에는 분석 조건을 잡는 데 이용하였던 붉은색 파프리카에서 가장 양이 많았던 카로티노이드 성분인 capsanthin의 표준품을 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 stock solution을 만든 후 이용하였다.

### 2.1. 직선성 (Linearity)

Capsanthin을 1~200 µg/mL 범위 안의 13가지 농도로 제조하여 UPLC 분석하였다. 내부표준물질로  $\beta$ -apo-8'-carotenal를 50µg/mL로 함께 분석하였으며, 3일에 걸쳐 같은 분석을 수행한 뒤 평균값을 이용하였다. 농도에 따른 피크의 면적을 구해 단순 선형회귀곡선의 형태로 검량선을 작성하였다. 검량선의  $R^2$ 값으로 직선성을 판단하였으며,  $R^2$ 값이 0.99 이상의 값을 나타내어 성분의 함량을 평가하는 검량선으로 이용하였다.

13가지 농도의 3일간 분석 결과는 Table. 3과 같으며, 그에 따른 검량선 그래프는 Fig. 13와 같다. Capsanthin 검량선의 회귀식은  $y=18040x-13796$ 이고 상관계수( $R^2$ )는 0.9998로 확립한 분석 조건 하에서 높은 직선성을 나타내었다.

**Table 3. Linearity of capsanthin 1-200µg/mL. (3 days)**

Conc. (µg/mL)	1	2.5	5	7.5	10	12.5	25	50	75	100	125	150	200
1st day	18803	47521	97121	139632	197329	239865	419077	906470	1399460	1773695	2288790	2821181	3632603
2nd day	16404	38832	81004	118972	166364	205210	403283	854076	1327713	1782402	2278996	2697287	3675231
3rd day	16330	40316	80212	119467	163333	203294	404528	851883	1296586	1703704	2174079	2587289	3514197
Average	17179	42223	86112	126024	175675	216123	408963	870810	1341253	1753267	2247288	2701919	3607344
SD	1407	4648	9542	11788	18814	20583	8781	30902	52757	43143	63590	117015	83436

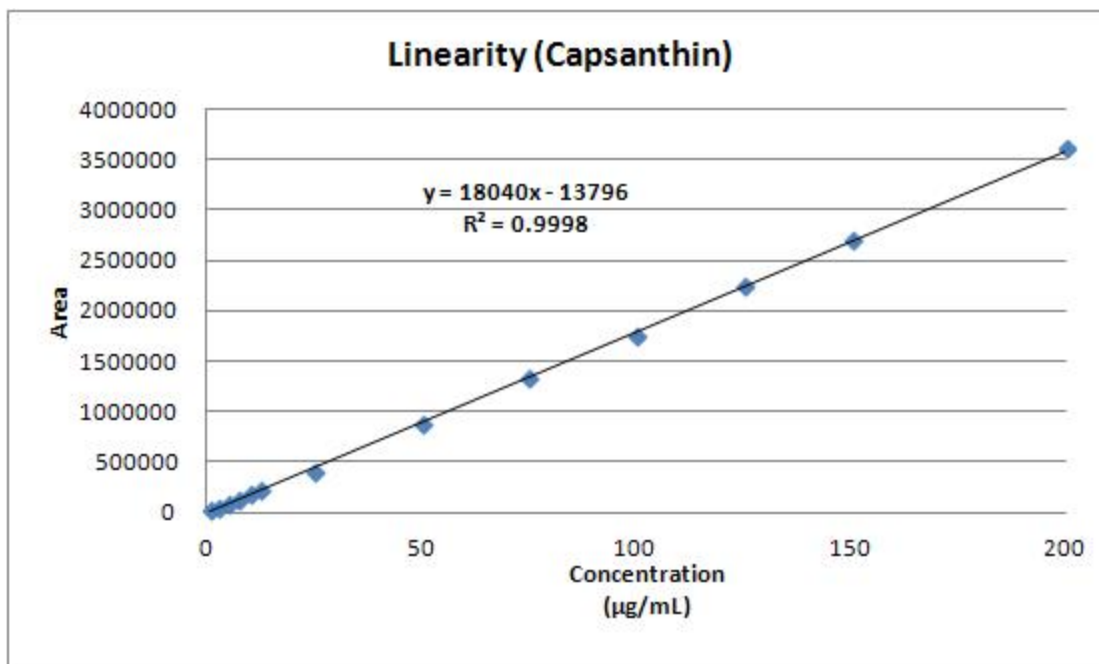


Fig. 13. Calibration equation of capsanthin 1-200µg/mL. The equation ( $y = Ax + B$ ) was as follows; Slope (A) : 18040, intercept (B) : -13796, correlation coefficient ( $R^2$ ) : 0.9998.



## 2.2. 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

검출한계는 배경 노이즈와 확실하게 구분되는 분석물질의 최저농도를 말하는 것으로, 시료 대 잡음 비율(S/N ratio, signal to noise ratio)이 3.3일 때의 값을 의미한다. 정량한계는 적합한 정밀성과 정확성으로 정량적으로 실측될 수 있는 시료 내 분석물질의 최저량을 말하는 것으로 S/N ratio가 10일 때의 값을 의미한다(Kim 등 2013).

Capsanthin 검량선에서 y절편의 표준편차와 기울기를 이용하여 다음과 같이 계산하였다.

LOD

$$= 3.3 * (\text{standard deviation of response/slope of calibration curve})$$

LOQ

$$= 10 * (\text{standard deviation of response/slope of calibration curve})$$

이를 통하여 구한 capsanthin의 LOD, LOQ 값은 각각 2.4 µg/mL와 7.2 µg/mL이었다.

## 2.3. 정밀도(Precision) 및 정확도(Accuracy)

정밀도(Precision)는 균일한 검체로부터 여러 번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 근접성(분산정도)을 의미한다(KFDA 2004). 직선성을 나타내는 범위 중 50, 75, 100 µg/mL의 농도에서 하루에 5회 반복 실험하여 일내(intra-day) 정밀도를 구하였으며, 5일간 반복 실험하여 일간(inter-day) 정밀도를 구하였다. 측정값의 RSD(Relative standard deviation, %)를 통하여 정밀도를 계산하였다.

**Table 4. Raw data of intra- and inter-day experiments.**

Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Intra-day			Inter-day		
	50	75	100	50	75	100
Area 1	834736	1286550	1741224	906470	1399460	1773695
Area 2	822305	1270312	1708897	854076	1327713	1782402
Area 3	833909	1292359	1693352	851883	1296586	1703704
Area 4	782327	1194446	1683235	834736	1286550	1741224
Area 5	800410	1254405	1671610	908002	1376956	1787454
Calculated Conc. 1	47.0	72.1	97.3	51.0	78.3	99.1
Calculated Conc. 2	46.3	71.2	95.5	48.1	74.4	99.6
Calculated Conc. 3	47.0	72.4	94.6	48.0	72.6	95.2
Calculated Conc. 4	44.1	67.0	94.1	47.0	72.1	97.3
Calculated Conc. 5	45.1	70.3	93.4	51.1	77.1	99.8
Average	45.9	70.6	95.0	49.0	74.9	98.2
SD	1.3	2.2	1.5	1.9	2.7	1.9

Table 5. Intra- and inter-day precision and accuracy of developed method.

	농도 ( $\mu\text{g/mL}$ )	Intra-day (n=5)		Inter-day (5 days)	
		Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
Capsanthin	50	91.86	2.75	98.10	3.83
	75	94.12	3.09	99.87	3.66
	100	94.98	1.57	98.20	1.98

정확도(Accuracy)는 분석물질의 참값에 대한 분석법에 의해 얻어진 평균시험 결과의 근접성을 의미한다(Kim 등 2013). 표준물질의 값에 대한 측정 평균값의 회수율(recovery)을 통하여 정확도를 계산하였으며, 정밀도와 마찬가지로 일내, 일간 정확도를 계산하였다.

일내 및 일간 반복 실험의 결과는 Table. 4와 같으며, 이를 통하여 계산한 정밀도 및 정확도의 결과는 Table. 5와 같다. 일내 RSD값은 1.57~3.09%, 일간 RSD값은 1.98~3.83%를 나타냈으며, 회수율은 일내와 일간에서 각각 91.86~94.98%, 98.10~99.87%의 값을 나타내었다.

이러한 결과를 바탕으로 본 연구에서 개발한 분석법이 capsanthin을 포함한 10종 카로티노이드를 분석하는 데에 적절한 직선성, 감도 및 정밀도와 정확도를 갖고 있음을 검증하였다.

## IV. 정량 결과 및 고찰

### 1. 생시료의 정량 평가

#### 1.1. 시료의 크로마토그램

본 연구에서 정량 분석을 수행한 시료는 총 15가지이며, 각각은 다음과 같다.

붉은색 파프리카	품종 : 레드마운틴
	품종 : 바이런
	품종 : 시로코
주황색 파프리카	품종 : 오렌지프로
노란색 파프리카	품종 : 피에스타
	품종 : 볼란테
녹색 파프리카	품종 : 레드마운틴
	품종 : 바이런
붉은색 피망	
녹색 피망	
붉은색 고추	
녹색 고추	
단호박	품종 : 예비수
	품종 : TCUP
	품종 : 큐리유타카

10종 카로티노이드의 Standard Curve를 통하여 시료 내 성분의 양을 구하였으며, 각 시료의 크로마토그램은 Fig. 14~28과 같다.

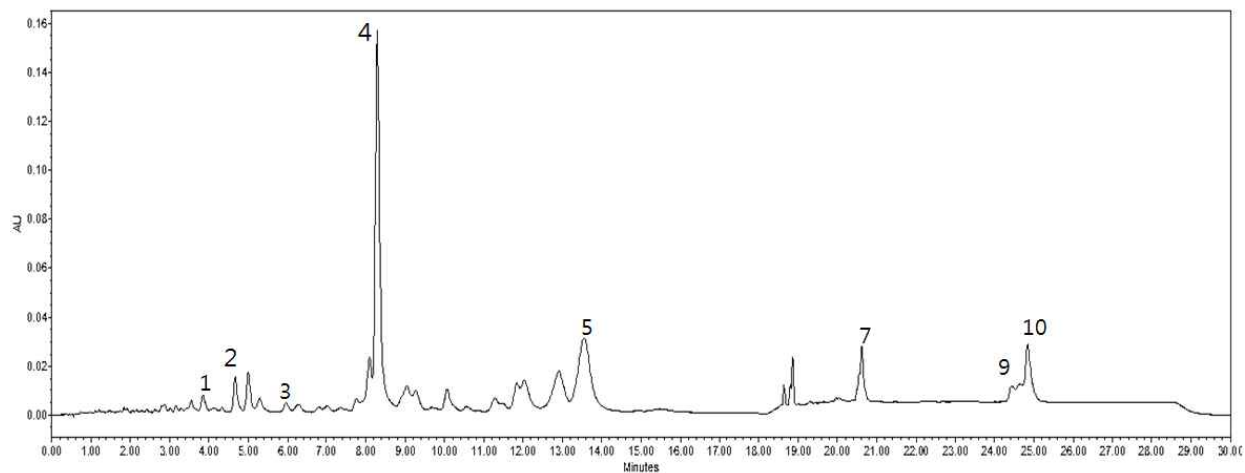


Fig. 14. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in red paprika. (red mountain) Samples were separated on BEH C18 column; 1. neoxanthin, 2. capsorubin, 3. violaxanthin, 4. capsanthin, 5. zeaxanthin, 7.  $\beta$ -cryptoxanthin, 9.  $\alpha$ -carotene, 10.  $\beta$ -carotene.

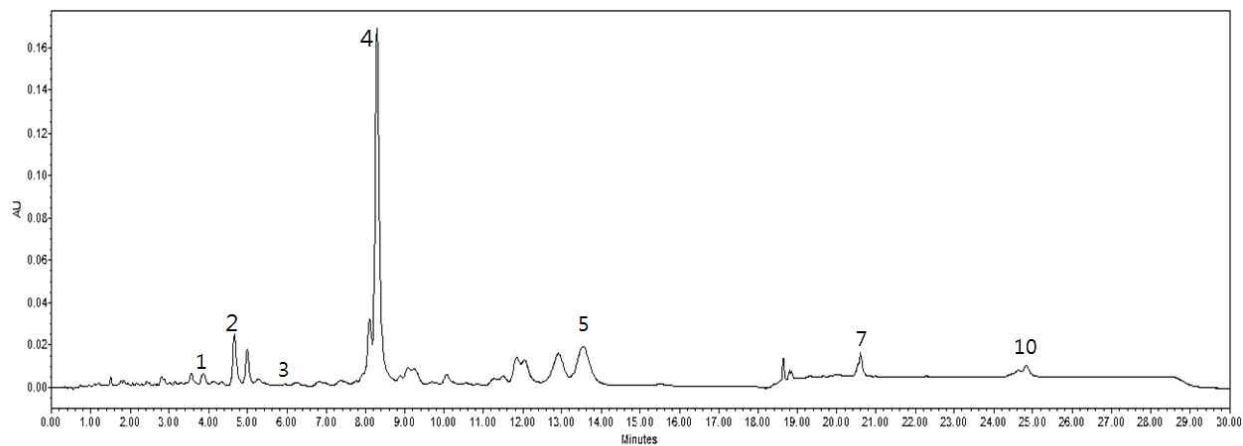


Fig. 15. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in red paprika. (veyron) Samples were separated on BEH C18 column; 1. neoxanthin, 2. capsorubin, 3. violaxanthin, 4. capsanthin, 5. zeaxanthin, 7.  $\beta$ -cryptoxanthin, 10.  $\beta$ -carotene.

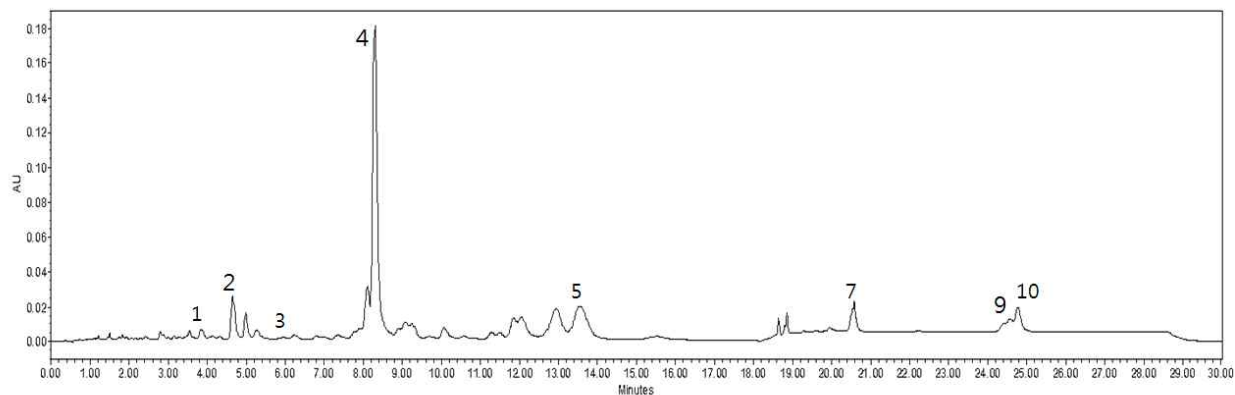


Fig. 16. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in red paprika. (scirocco) Samples were separated on BEH C18 column; 1. neoxanthin, 2. capsorubin, 3. violaxanthin, 4. capsanthin, 5. zeaxanthin, 7.  $\beta$ -cryptoxanthin, 9.  $\alpha$ -carotene, 10.  $\beta$ -carotene.



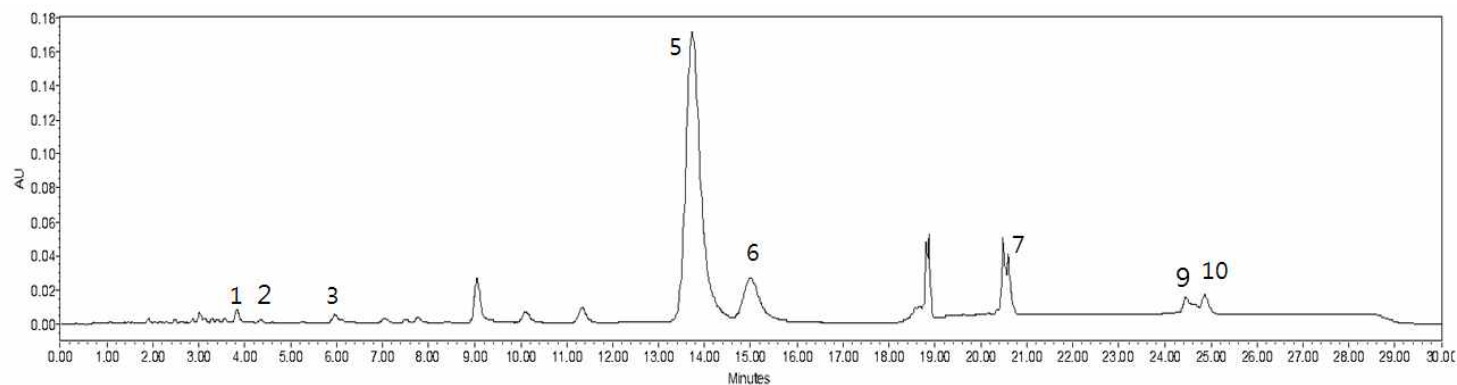


Fig. 17. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in orange paprika. (orange pro) Samples were separated on BEH C18 column; 1. neoxanthin, 2. capsorubin, 3. violaxanthin, 5. zeaxanthin, 6. lutein, 7.  $\beta$ -cryptoxanthin, 9.  $\alpha$ -carotene, 10.  $\beta$ -carotene.

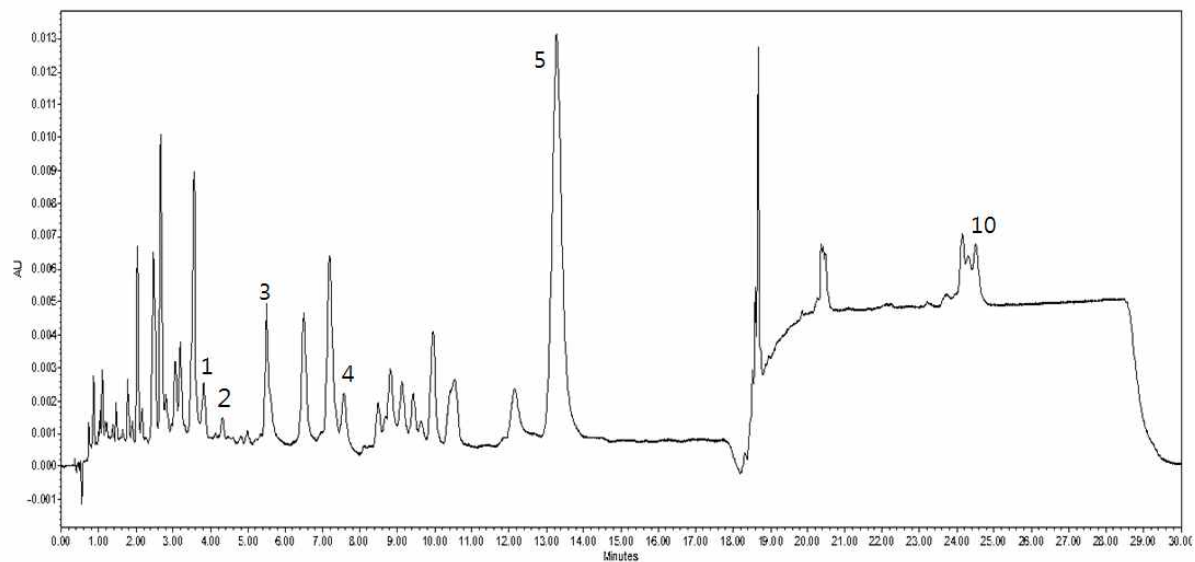


Fig. 18. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in yellow paprika. (fiesta) Samples were separated on BEH C18 column; 1. neoxanthin, 2. capsorubin, 3. violaxanthin, 4. capsanthin, 5. zeaxanthin, 10.  $\beta$ -carotene.

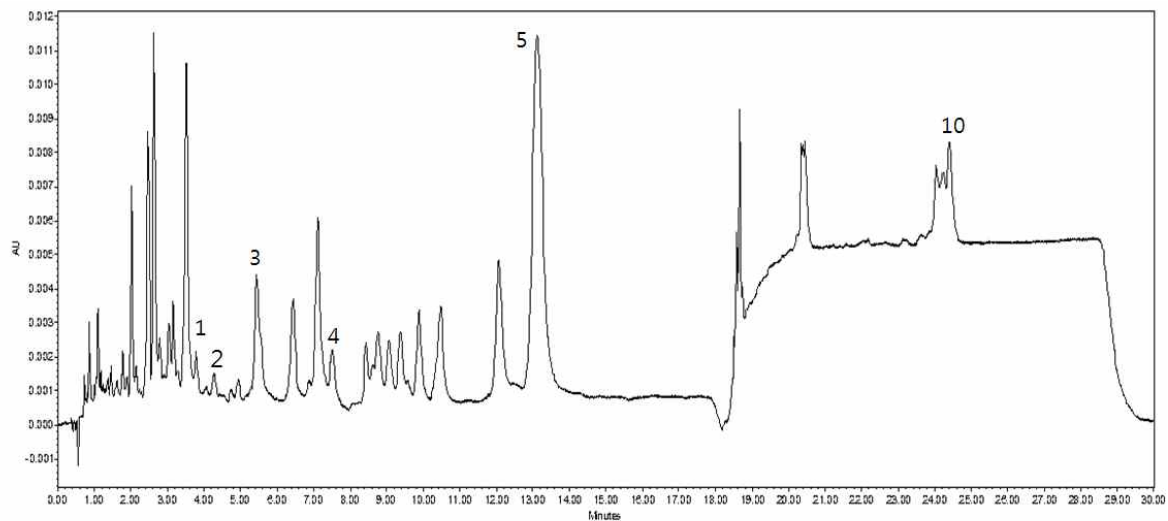


Fig. 19. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in yellow paprika. (volante) Samples were separated on BEH C18 column; 1. neoxanthin, 2. capsorubin, 3. violaxanthin, 4. capsanthin, 5. zeaxanthin, 10.  $\beta$ -carotene.

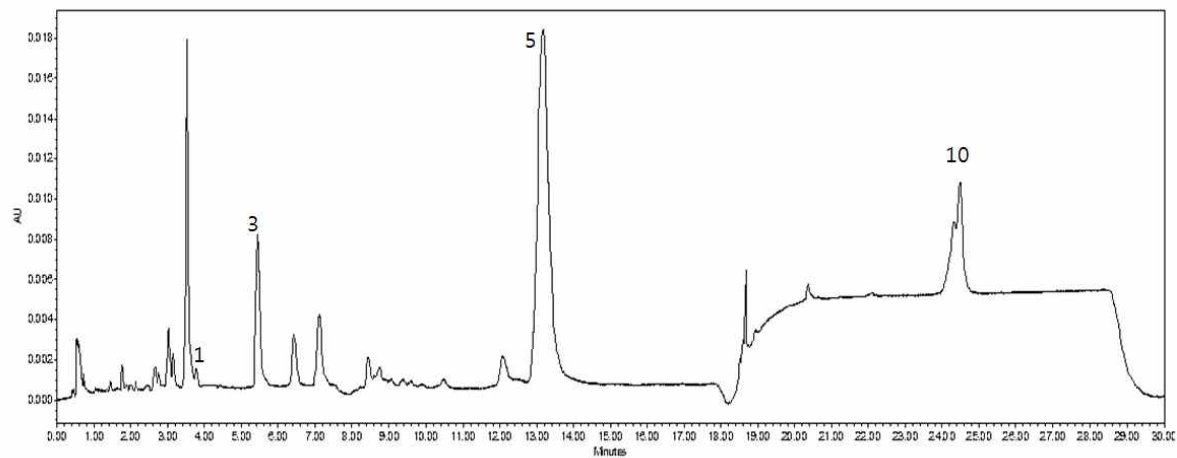


Fig. 20. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in green paprika. (red mountain) Samples were separated on BEH C18 column; 1. neoxanthin, 3. violaxanthin, 5. zeaxanthin, 10.  $\beta$ -carotene.

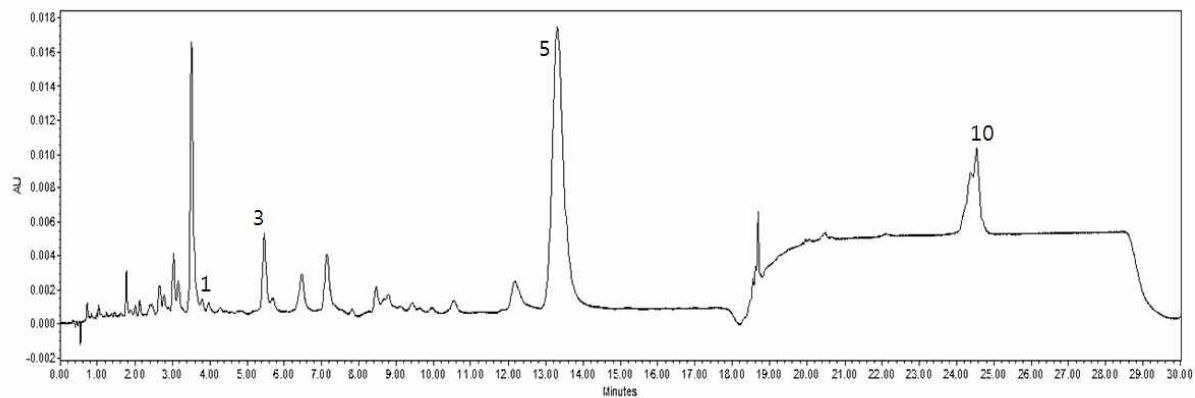


Fig. 21. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in green paprika. (veyron) Samples were separated on BEH C18 column; 1. neoxanthin, 3. violaxanthin, 5. zeaxanthin, 10.  $\beta$ -carotene.

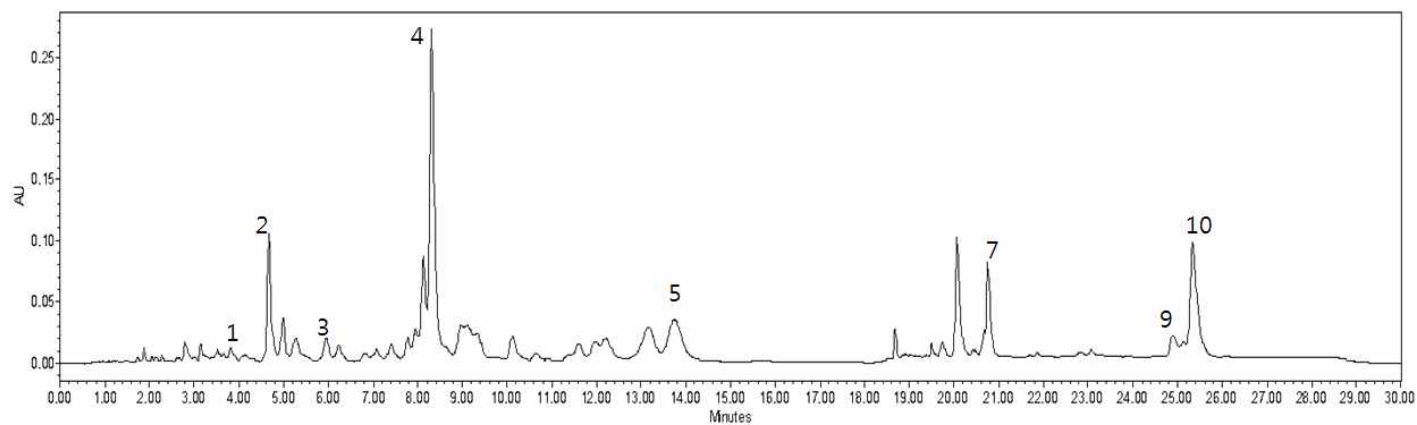


Fig. 22. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in red bell pepper. Samples were separated on BEH C18 column; 1. neoxanthin, 2. capsorubin, 3. violaxanthin, 4. capsanthin, 5. zeaxanthin, 7.  $\beta$ -cryptoxanthin, 9.  $\alpha$ -carotene, 10.  $\beta$ -carotene.

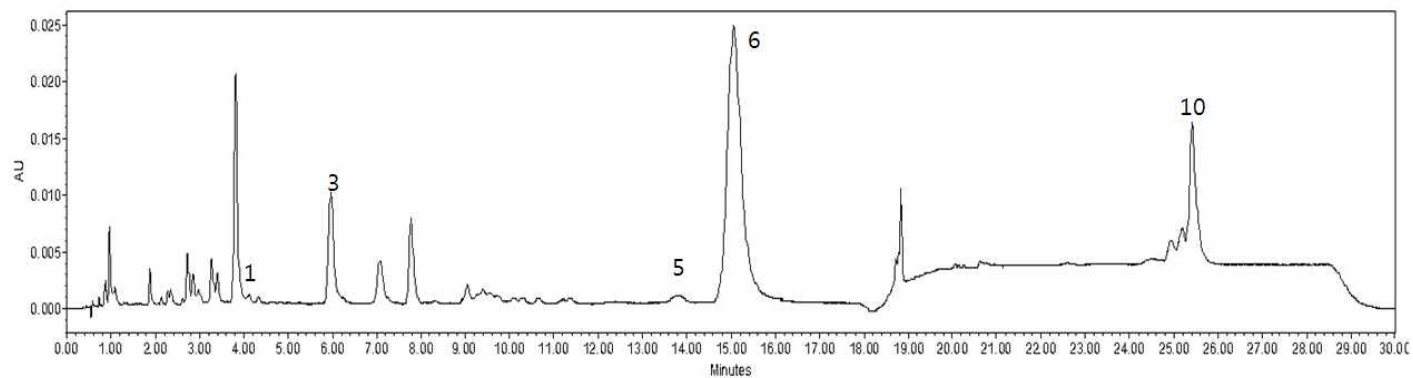


Fig. 23. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in green bell pepper. Samples were separated on BEH C18 column; 1. neoxanthin, 3. violaxanthin, 5. zeaxanthin, 6. lutein, 10.  $\beta$ -carotene.

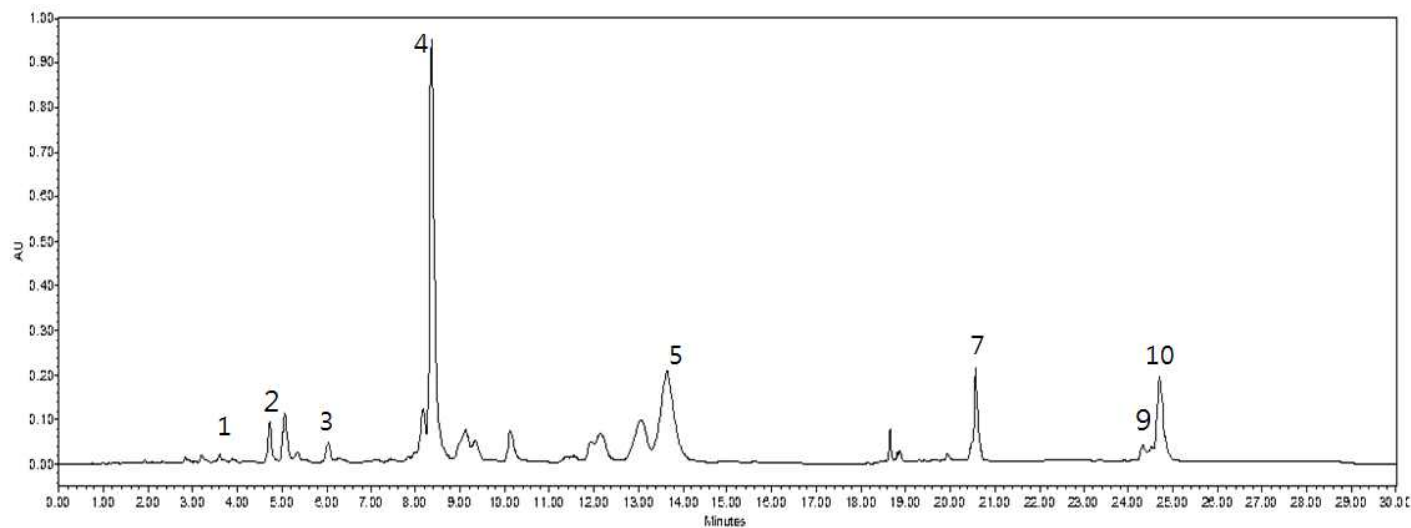


Fig. 24. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in red pepper. Samples were separated on BEH C18 column; 1. neoxanthin, 2. capsorubin, 3. violaxanthin, 4. capsanthin, 5. zeaxanthin, 7.  $\beta$ -cryptoxanthin, 9.  $\alpha$ -carotene, 10.  $\beta$ -carotene.



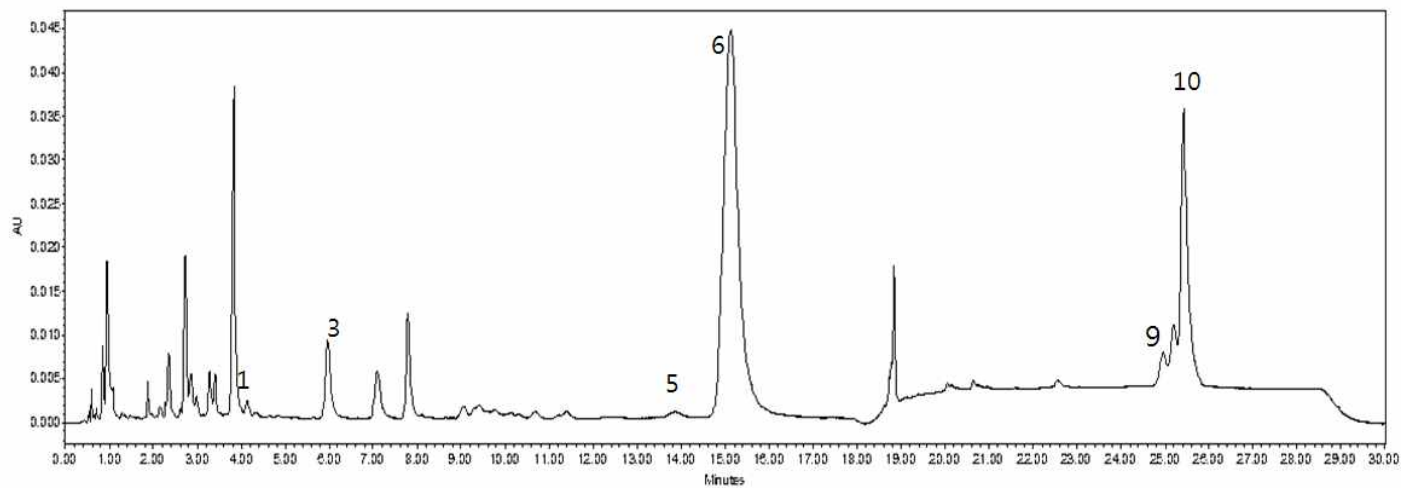


Fig. 25. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in green pepper. Samples were separated on BEH C18 column; 1. neoxanthin, 3. violaxanthin, 5. zeaxanthin, 6. lutein, 9.  $\alpha$ -carotene, 10.  $\beta$ -carotene.

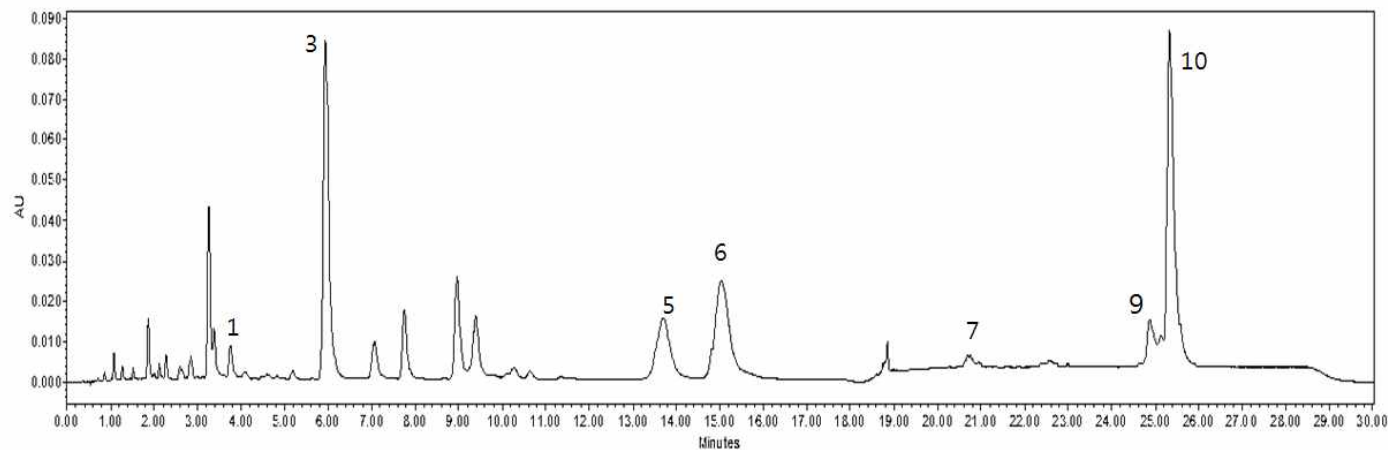


Fig. 26. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in sweet pumpkin (evis). Samples were separated on BEH C18 column; 1. neoxanthin, 3. violaxanthin, 5. zeaxanthin, 6. lutein, 7.  $\beta$ -cryptoxanthin, 9.  $\alpha$ -carotene, 10.  $\beta$ -carotene.

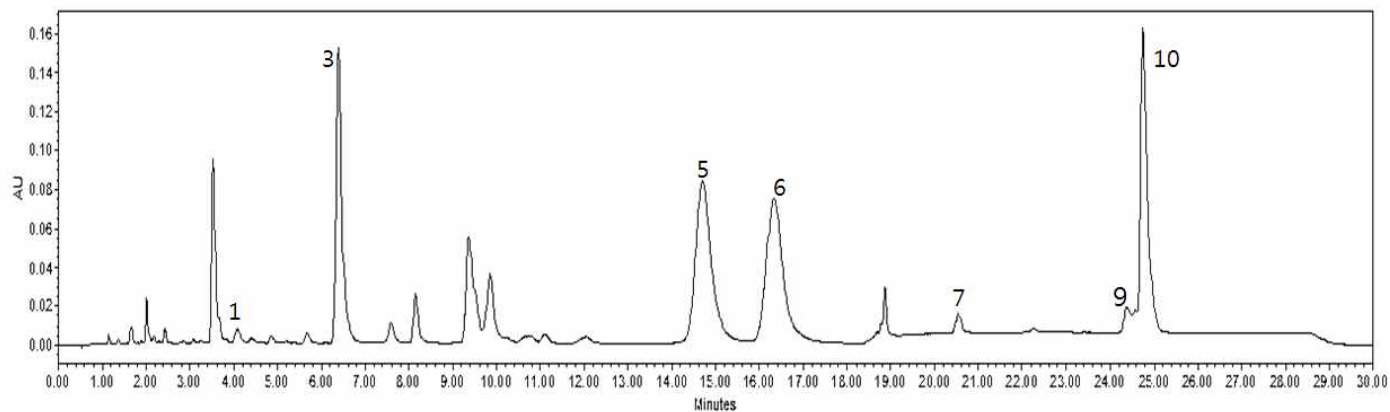


Fig. 27. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in sweet pumpkin (tcup). Samples were separated on BEH C18 column; 1. neoxanthin, 3. violaxanthin, 5. zeaxanthin, 6. lutein, 7.  $\beta$ -cryptoxanthin, 9.  $\alpha$ -carotene, 10.  $\beta$ -carotene.

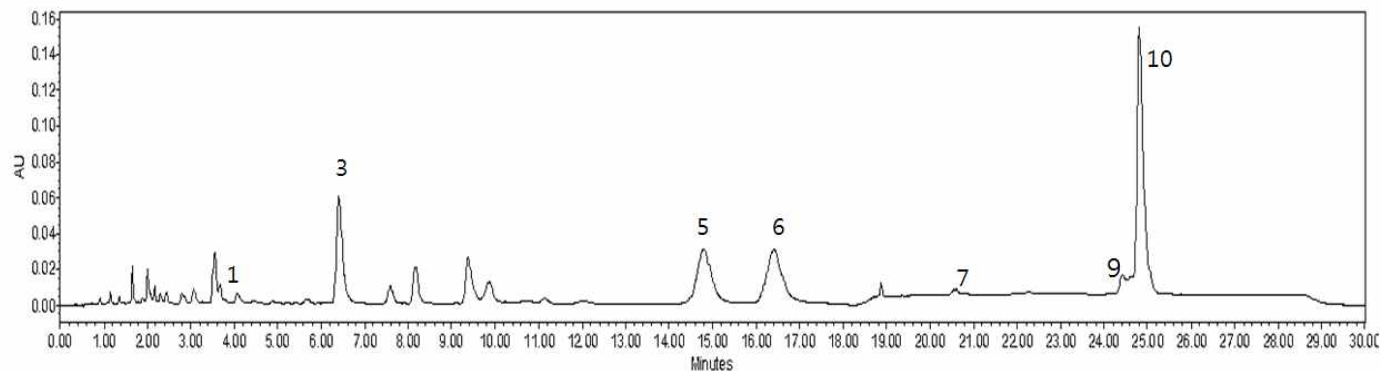


Fig. 28. UPLC chromatogram of carotenoid profiles in sweet pumpkin (kuriyutaka). Samples were separated on BEH C18 column; 1. neoxanthin, 3. violaxanthin, 5. zeaxanthin, 6. lutein, 7.  $\beta$ -cryptoxanthin, 9.  $\alpha$ -carotene, 10.  $\beta$ -carotene.

## 1.2. 통계처리

모든 분석은 3회 이상 반복 수행하여 평균±표준편차로 표기하였다. 각 실험 결과는 IBM SPSS Statistics 20 프로그램을 이용하여 일원배치 분산분석(One-way ANOVA)과  $p < 0.05$  수준에서 Duncan의 다중범위 검정법(Duncan's multiple range test)을 실시하여 비교하였다.

## 2. 결과 및 고찰

시료의 추출에 있어서는 가속용매추출장치(ASE, accelerated solvent extractor)를 이용하였다. ASE는 고온과 고압 조건에서 추출하여 용매 및 시간이 적게 소요되기 때문에 추출 효율이 높다. 카로티노이드의 경우 특히 추출 이후에도 검화, 분획 등의 과정을 거쳐야 하기 때문에 전처리에 있어 소요 시간을 감소시키는 것이 중요하다. 그렇기 때문에 전통적인 추출 방법보다는 ASE를 이용하여 추출하는 것이 많은 시료를 분석하는 데에는 유리하기에 가속용매 추출법을 사용하였다.

지용성인 카로티노이드는 식품 내에서 주로 지방산이 mono- 혹은 di- 결합한 형태로 존재한다. 카로티노이드를 포함한 추출물을 알칼리와 반응시키면 검화 반응이 일어나 카로티노이드에 결합해 있던 지방산이 지방산염의 형태로 분리된다. 검화 후 diethyl ether, hexane, cyclohexane과 같은 유기용매로 지용성층만을 분획하여 순수한 카로티노이드 물질을 얻을 수 있다. 지방산이 mono-/di- 결합한 형태의 카로티노이드를 크로마토그래피 분석하는 경우도 있지만, 분석 시간이 과도하게 길어지기 때문에 검화 및 분획을 하여 분석을 하는 편이 일반적이다.

**Table 6. Carotenoids contents in different colored paprika, bell pepper, pepper and sweet pumpkin.** (Unit : mg/100g dry weight)

	Neoxanthin	Capsorubin	Violaxanthin	Capsanthin	Zeaxanthin	Lutein	$\beta$ -cryptoxanthin	Lycopene	$\alpha$ -carotene	$\beta$ -carotene	Total Carotenoids
Red paprika (red mountain)	0.73±0.04 <sup>c</sup>	1.31±0.04 <sup>d</sup>	0.34±0.01 <sup>g</sup>	14.70±0.13 <sup>e</sup>	5.43±0.04 <sup>de</sup>	-	0.15±0.01 <sup>cd</sup>	-	0.05±0.01 <sup>e</sup>	0.29±0.02 <sup>f</sup>	22.98±0.02 <sup>f</sup>
Red paprika (veyron)	0.59±0.04 <sup>de</sup>	2.15±0.03 <sup>c</sup>	0.27±0.08 <sup>g</sup>	17.23±0.57 <sup>d</sup>	3.87±0.26 <sup>efg</sup>	-	0.06±0.01 <sup>def</sup>	-	-	0.09±0.01 <sup>hi</sup>	24.24±0.88 <sup>ef</sup>
Red paprika (scirocco)	0.60±0.03 <sup>de</sup>	2.37±0.15 <sup>c</sup>	0.17±0.01 <sup>g</sup>	18.46±0.01 <sup>c</sup>	3.85±0.08 <sup>efg</sup>	-	0.12±0.01 <sup>de</sup>	-	0.03±0.01 <sup>e</sup>	0.21±0.02 <sup>fg</sup>	25.79±0.14 <sup>e</sup>
Orange paprika (orange pro)	0.63±0.09 <sup>cd</sup>	0.14±0.01 <sup>e</sup>	0.35±0.04 <sup>g</sup>	-	31.37±2.81 <sup>b</sup>	5.38±1.38 <sup>c</sup>	0.22±0.06 <sup>c</sup>	-	0.11±0.05 <sup>cd</sup>	0.14±0.04 <sup>gh</sup>	38.31±1.21 <sup>d</sup>
Yellow paprika (fiesta)	0.14±0.01 <sup>f</sup>	0.05±0.01 <sup>e</sup>	0.48±0.07 <sup>g</sup>	0.53±0.01 <sup>f</sup>	2.23±0.04 <sup>ghi</sup>	-	-	-	-	0.05±0.00 <sup>i</sup>	3.48±0.09 <sup>j</sup>
Yellow paprika (volante)	0.08±0.01 <sup>f</sup>	0.03±0.00 <sup>e</sup>	0.23±0.05 <sup>g</sup>	0.43±0.04 <sup>f</sup>	0.81±0.42 <sup>hi</sup>	-	-	-	-	0.05±0.01 <sup>i</sup>	1.62±0.54 <sup>j</sup>
Green paprika (red mountain)	0.09±0.01 <sup>f</sup>	-	0.68±0.04 <sup>g</sup>	-	3.87±0.60 <sup>efg</sup>	-	-	-	-	0.11±0.02 <sup>hi</sup>	4.74±0.67 <sup>j</sup>
Green paprika (veyron)	0.09±0.01 <sup>f</sup>	-	0.49±0.11 <sup>g</sup>	-	4.40±1.69 <sup>efg</sup>	-	-	-	-	0.06±0.03 <sup>i</sup>	5.03±1.84 <sup>j</sup>
Red bell pepper	1.14±0.12 <sup>b</sup>	9.54±0.19 <sup>a</sup>	3.08±0.90 <sup>e</sup>	27.94±0.54 <sup>b</sup>	6.79±0.28 <sup>d</sup>	-	0.54±0.04 <sup>b</sup>	-	0.19±0.04 <sup>b</sup>	1.15±0.09 <sup>d</sup>	50.34±0.93 <sup>c</sup>
Green bell pepper	0.10±0.02 <sup>f</sup>	-	0.80±0.01 <sup>g</sup>	-	0.28±0.01 <sup>i</sup>	6.43±0.08 <sup>c</sup>	-	-	-	0.18±0.01 <sup>gh</sup>	7.77±0.10 <sup>h</sup>
Red pepper	1.12±0.06 <sup>b</sup>	8.28±0.20 <sup>b</sup>	3.68±0.30 <sup>d</sup>	91.89±0.30 <sup>a</sup>	39.41±0.40 <sup>a</sup>	-	1.54±0.08 <sup>a</sup>	-	0.48±0.02 <sup>a</sup>	2.21±0.04 <sup>a</sup>	148.60±0.72 <sup>a</sup>
Green pepper	0.15±0.01 <sup>f</sup>	-	2.12±0.37 <sup>f</sup>	-	0.28±0.00 <sup>j</sup>	12.44±0.17 <sup>b</sup>	-	-	0.03±0.00 <sup>e</sup>	0.51±0.01 <sup>e</sup>	15.52±0.20 <sup>g</sup>
Sweet pumpkin (evis)	0.64±0.01 <sup>cd</sup>	-	6.04±0.13 <sup>b</sup>	-	2.61±0.16 <sup>gh</sup>	5.47±0.03 <sup>c</sup>	0.01±0.01 <sup>f</sup>	-	0.08±0.01 <sup>de</sup>	1.11±0.06 <sup>d</sup>	15.94±0.23 <sup>g</sup>
Sweet pumpkin (tcup)	1.25±0.04 <sup>a</sup>	-	13.73±0.08 <sup>a</sup>	-	23.34±1.45 <sup>c</sup>	23.44±1.56 <sup>a</sup>	0.05±0.01 <sup>ef</sup>	-	0.15±0.01 <sup>bc</sup>	1.80±0.04 <sup>b</sup>	63.75±3.12 <sup>b</sup>
Sweet pumpkin (kuriyutaka)	0.50±0.09 <sup>e</sup>	-	5.33±0.28 <sup>c</sup>	-	4.59±0.08 <sup>ef</sup>	5.39±0.25 <sup>c</sup>	0.01±0.00 <sup>f</sup>	-	0.07±0.01 <sup>de</sup>	1.36±0.06 <sup>c</sup>	17.24±0.60 <sup>g</sup>

10종 카로티노이드 정량 분석 결과는 Table. 6과 같다. 15가지의 시료 중에서 단호박(품종 tcup)에서의 neoxanthin 함량이  $1.25 \pm 0.04$  mg/100g dw(dry weight)로 가장 많았으며, capsorubin의 경우 붉은색, 주황색, 노란색 파프리카와 붉은색 피망과 붉은색 고추에 존재하였으며 피망에서  $9.54 \pm 0.19$  mg/100g dw로 가장 많은 양이 존재하였다. Violaxanthin은 단호박(품종 tcup)에서  $13.73 \pm 0.08$  mg/100g dw로 가장 많이 존재하였으며, capsorubin은 붉은색, 노란색 파프리카와 붉은색 피망과 붉은색 고추에 존재하였으며 붉은색 고추에서  $91.89 \pm 0.30$  mg/100g dw로 가장 많이 존재하였다. 모든 시료에서 zeaxanthin을 정량하였으며 붉은색 고추에서  $39.41 \pm 0.40$  mg/100g dw로 가장 많이 존재하였다. Lutein은 주황색 파프리카, 녹색 피망, 녹색 고추, 단호박에서 존재하였으며 단호박(품종 tcup)에서  $23.44 \pm 1.56$  mg/100g dw로 가장 많은 양이 존재하였다.  $\beta$ -cryptoxanthin의 경우 노란색 파프리카와 녹색의 파프리카, 피망, 고추에서는 분석되지 않았다.  $\alpha$ -Carotene과  $\beta$ -carotene은 붉은색 고추에서 각각  $0.48 \pm 0.02$  mg/100g dw,  $2.21 \pm 0.04$  mg/100g dw로 가장 많이 존재하였다.

정량 분석한 10종의 카로티노이드를 합한 총 카로티노이드의 양을 보면, Capsicum 중에서 붉은색이나 주황색의 시료가 노란색이나 녹색의 시료보다 월등히 많은 양의 카로티노이드를 함유하는 것으로 나타났다. 이는 붉은색 시료에서의 많은 capsanthin, capsorubin 함량이 특히 영향을 미쳤으며, 주황색 파프리카와 붉은색 고추의 많은 zeaxanthin 함량이 영향을 미치고 있기 때문이다.

단호박에서 예비수 품종은 일반적으로 널리 판매되는 진한 녹색의 껍질을 갖는 단호박 품종이며, tcup 품종은 ‘오렌지단호박’이라는 상품명으로 판매가 되는 주황색 껍질의 단호박 품종이다. 큐리유타카 품종은 ‘블랙단호박’이라는 상품명으로 판매가 되는 검은색에 가까운 진한 녹색의 껍질을 갖는 단호박 품종이다. 정량 분석의 결

과, tcup 품종이 모든 카로티노이드 성분이 다른 품종보다 양이 많고 10종 카로티노이드의 합이  $63.75 \pm 3.12 \text{mg}/100 \text{g dw}$ 을 나타내었으며, 나머지 두 품종 간에는 큰 차이가 있지 않았다.

카로티노이드의 함량과 조성은 유전적인 요인과 함께 품종, 속도, 기후, 생산지, 수확 조건, 가공 및 저장 조건 등의 환경적인 요인에 의해서도 영향을 받는 것으로 알려져 있는데(Rodriguez-Amaya 2010), 본 연구에서도 품종에 따라 다른 함량과 조성을 갖는 것을 확인하였다.

본 연구에서 확립한 분석 조건은 기존의 분석 조건보다 비교적 적은 시간인 30분의 분석 시간을 갖기 때문에 파프리카, 피망, 고추, 단호박 이외에도 다양한 카로티노이드 함유 식품의 정량 분석을 보다 정확하고 신속하게 할 수 있으리라 기대한다.



## V. 요약 및 결론

본 연구에서는 HPLC보다 작은 크기의 입자로 충전된 컬럼을 이용하여 더 높은 압력에서 분석이 가능한 UPLC를 이용하여 10종의 카로티노이드를 30분 내에 분석할 수 있는 방법을 개발 및 검증하였고, 이를 이용하여 다양한 색과 품종의 생시료 내의 카로티노이드를 정량 분석하였다.

1. 분석에 앞서 시료의 추출 및 전처리 과정을 진행하였다. 모든 시료는 가속용매추출장치(ASE)를 이용하여 추출하였다. ASE는 추출 시 온도와 압력을 조절할 수 있으며 용매와 시간이 적게 소요되기 때문에 좋은 추출 효율을 나타낸다. 추출 용매는 acetone을 이용, static time 3min, static cycles 3회, pressure 1500psi, 80℃ 조건에서 추출하였다. 추출 후 카로티노이드에 결합해 있던 지방산을 지방산염의 형태로 분리하기 위해 30% KOH/MeOH 용액을 첨가하여 암실에서 검화 과정을 거쳤고 diethyl ether를 첨가한 뒤 분획 및 여과하여 이를 분석에 이용하였다.

2. UPLC를 이용하여 카로티노이드를 분석한 기존의 실험 조건 중에서 잔토필류를 포함하여 다양한 카로티노이드를 분석한 논문 2편(각각 BEH C18 컬럼, HSS T3 컬럼 이용)을 선정하여, 두 조건으로 분석을 수행하여 크로마토그램의 피크를 살펴본 뒤 컬럼을 선택하였다. HSS T3 컬럼은 high strength silica를 충전재로 하며 선택성에 최적화 되어 있기 때문에 잔토필류의 retention이 향상되었다. 따라서 이후의 분석법 개발은 HSS T3 컬럼을 선정하여 진행하였다.

3. Acetonitrile, methanol, methylene chloride의 혼합 용액과 증류수를 이동상 용매 A, B로 사용하였다. 세 가지 유기용매의 혼합 비율과 용매 A:B의 비율을 변화시켜 비교해 보았고, 강한 용매인 acetonitrile의 비율을 낮추어 피크의 retention을 증가시켰다. 이후의 농도 구배 조건을 확립하여 유속 0.5mL/min, 총 분석시간 30분의 분석법을 확립하였다. 이 조건 하에서 10종의 카로티노이드 표준품이 서로 간섭하지 않는 크로마토그램을 얻었다.

4. 분석법 검증을 위해 capsanthin을 이용하였다. 검량선은 1-200µg/mL 농도범위에서 상관계수(R<sup>2</sup>) 0.9998의 높은 직선성을 나타내었고 각각 2.4µg/mL, 7.2µg/mL의 검출한계와 정량한계를 나타내었다. 일내 RSD값은 1.57~3.09%, 일간 RSD값은 1.98~3.83%를 나타냈으며, 회수율은 일내와 일간에서 각각 91.86~94.98%, 98.10~99.87%의 값을 나타내었다. 이를 통하여 개발한 분석법이 적합함을 알 수 있었다.

5. 확립한 분석법을 이용하여 붉은색 파프리카 3종, 주황색 파프리카 1종, 노란색 파프리카 2종, 녹색 파프리카 2종, 피망(붉은색, 녹색), 고추(붉은색, 녹색), 단호박 3종의 카로티노이드를 정량 분석하였다. 붉은색과 주황색 파프리카에서는 7~8가지의 카로티노이드, 노란색 파프리카에서는 6가지의 카로티노이드, 녹색 파프리카에서는 4가지의 카로티노이드가 분석되었다. 붉은색 피망과 고추에서 8가지의 카로티노이드, 녹색 피망과 고추에서 4~5가지의 카로티노이드, 단호박에서 7가지의 카로티노이드가 분석되었다.

본 연구에서 개발하고 검증한 분석법을 이용, 다양한 카로티노이드 함유 식품의 정량 분석을 보다 정확하고 신속하게 하여 작물의 품

종 선택이나 식이 가이드라인 설정, 섭취량과 질병 예방 간의 관계 연구 등을 위한 기초자료를 제공하는 데에 도움이 될 수 있으리라 기대한다.

## 참고 문헌

- Chan C, Leung I, Lam KW, Tso MO. 1998. The occurrence of retinol and carotenoids in human subretinal fluid. *Curr. Eye Res.* 17: 890-895.
- Chauveau-Duriot B, Doreau M, Noziere P, Graulet B. 2010. Simultaneous quantification of carotenoids, retinol, and tocopherols in forages, bovine plasma, and milk: validation of a novel UPLC method. *Anal. Bioanal. Chem.* 397: 777-790.
- Chen ML, Lin YH, Yang CM, Hu ML. 2012. Lycopene inhibits angiogenesis both in vitro and in vivo by inhibiting MMP-2/uPA system through VEGFR2-mediated PI3K-Akt and ERK/p38 signaling pathways. *Mol. Nutr. Food Res.* 56: 889-899.
- Elliott R. 2005. Mechanisms of genomic and non-genomic actions of carotenoids. *Biochim. Biophys. Acta.* 1740: 147-154.
- Ghodratizadeh S, Kanbak G, Beyramzadeh M, Dikmen ZG, Memarzadeh S, Habibian R. 2014. Effect of carotenoid  $\beta$ -cryptoxanthin on cellular and humoral immune response in rabbit. *Vet. Res. Commun.* 38: 59-62.
- Guzman I, Hamby S, Romero J, Bosland PW, O'Connell MA. 2010. Variability of carotenoids biosynthesis in orange colored *Capsicum* spp.. *Plant Science.* 179: 49-59.

- KFDA. 2004. Analytical method guideline about validation of drugs and etc. Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea. pp. 1-18.
- Kim S, Kim JS. 2012. Method Validation and Quantification of Lutein and Zeaxanthin from Green Leafy Vegetables using the UPLC system. Korean J. Food Sci. Technol. 44(6): 686-691.
- Kim YJ, Ha N, Han SH, Jeon JY, Hwang MH, Im YJ, Lee SY, Chae SW, Kim MG. 2013. Confirmation of Schizandrin as a Marker Compound in *Jangsu* Omija Powder. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 42(2): 244-248.
- Kotake-Nara E, Asai A, Nagao A. 2005. Neoxanthin and fucoxanthin induce apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells. Cancer letters. 220: 75-84.
- Krinsky N, Johnson EJ. 2005. Carotenoid actions and their relation to health and disease. Mol. Aspects. Med. 26: 459-516.
- Krinsky N, Landrum JT, Bone RA. 2003. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. Annu. Rev. Nutr. 23: 171-201.
- Lee SW, Seo HY, Han BJ, Jeong YM, Kim JH, No KM, Kim KS. 2004. Use of accelerated solvent extraction method for determination of residual pesticides in agriculture products. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 47: 228-237.

- Matthews PD, Luo R, Wurtzel ET. 2003. Maize phytoene desaturase and zeta-carotene desaturase catalyze a poly-Z desaturation pathway: implications for genetic engineering of carotenoid content among cereal crops. *J. Exp. Bot.* 54: 2215–2230.
- Miller PE, Snyder DC. 2012. Phytochemicals and Cancer Risk A Review of the Epidemiological Evidence. *Nutr. Clin. Pract.* 27: 599–612.
- Pasquet V, Morisset P, Ihammouine S, Chepied A, Aumailley L, Berard JB, Serive B, Kaas R, Lanneluc I, Thierry V, Lafferriere M, Piot JM, Patrice T, Cadoret JP, Picot L. 2011. Antiproliferative Activity of Violaxanthin Isolated from Bioguided Fractionation of *Dunaliella tertiolecta* Extracts. *Mar. Drugs.* 9: 819–831.
- Rivera S, Canela-Garayoa R. 2012. Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. *J. Chromatogr. A* 1224: 1–10.
- Rivera S, Vilaro F, Canela R. 2011. Determination of carotenoids by liquid chromatography/mass spectrometry: effect of several dopants. *Anal. Bioanal. Chem.* 400: 1339–1346.
- Rodriguez-Amaya DB. 2010. Quantitative analysis, *in vitro* assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids—A review. *J. Food Compos. Anal.* 23: 726–740.
- Semba RD, Dagnelie G. 2003. Are lutein and zeaxanthin conditionally essential nutrients for eye health? *Med.*

Hypotheses 61: 465–472.

Soontornchaiboon W, Joo SS, Kim SM. 2012. Anti-inflammatory Effects of Violaxanthin Isolated from Microalga *Chlorella ellipsoidea* in RAW 264.7 Macrophages. Biol. Pharm. 35(7): 1137–1144.

Stahl W, Sies H. 2005. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. Biochim. Biophys. Acta. 1740: 101–107.

Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. 2004. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. Biomed. Pharmacother. 58: 100–110.

Voutilainen S, Nurmi T, Mursu J, Rissanen TH. 2006. Carotenoids and cardiovascular health. Am. J. Clin. Nutr. 83: 1265–1271.

Zhang X, Zhao WE, Hu L, Zhao L, Huang J. 2011. Carotenoids inhibit proliferation and regulate expression of peroxisome proliferators-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) in K562 cancer cells. Arch. Biochem. Biophys. 512: 96–106.

## Abstract

The objective of this study was the method development and validation for the simultaneous determination of ten kinds of carotenoids (neoxanthin, capsorubin, violaxanthin, capsanthin, zeaxanthin, lutein,  $\beta$ -cryptoxanthin, lycopene,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene) using ultra performance liquid chromatography (UPLC) equipped with HSS T3 column, and then we quantitatively analyzed carotenoids from four colored paprika (red, orange, yellow and green), two colored bell pepper, pepper, and sweet pumpkin.

Capsanthin out of carotenoids was validated, and showed good linearity ( $R^2 = 0.9998$ ) in 1–200  $\mu\text{g/mL}$  with 2.4  $\mu\text{g/mL}$  and 7.2  $\mu\text{g/mL}$  of LOD (Limit of Detection) and LOQ (Limit of Quantification), respectively. The RSD for intra- and inter-day precision was less than 3.83%. The recovery was in the range of 91.86–99.87%.

We detected 7–8 carotenoids from red and orange paprika, 6 carotenoids from yellow paprika, and 4 carotenoids from green paprika. Capsanthin ( $18.46 \pm 0.01$  mg/100g dry weight,  $27.94 \pm 0.54$  mg/100g dw,  $91.89 \pm 0.30$  mg/100g dw) was the highest in red paprika, red bell pepper, red pepper, respectively, zeaxanthin ( $31.37 \pm 2.81$  mg/100g dw,  $2.23 \pm 0.04$  mg/100g dw,  $4.40 \pm 1.89$  mg/100g dw) in orange, yellow, green paprika, respectively, lutein ( $6.43 \pm 0.08$  mg/100g dw,  $12.44 \pm 0.17$  mg/100g dw,  $23.44 \pm 1.56$  mg/100g dw) in green bell pepper, green pepper, sweet pumpkin, respectively.



Key words : Carotenoids, UPLC, Method Validation, Paprika,  
Pepper and Sweet Pumpkin

Student number : 2012-23550